

Université Jean Monnet de Saint-Etienne

Académie de Lyon

*Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes
Aromatiques et Médicinales (EA 3061)*

Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'Université Jean Monnet

Biosynthèse du 2- phényléthanol et sécrétion du parfum chez la rose

Jana Machenaud

Discipline : Biologie – Physiologie végétale

Soutenue le 23 septembre 2010, devant le jury composé de :

Mohammed Bendahmane	Directeur de recherches	INRA de Lyon	Rapporteur
Christiane Gallet	Maître de conférences	Université de Savoie	Rapporteur
Laurence Hibrand Saint-Oyant	Ingénieur de recherches	INRA d'Angers	Examinatrice
Sandrine Eveillard	Chargée de recherches	INRA de Bordeaux	Examinatrice
Jean-Claude Caissard	Maître de conférences	Université de Saint-Etienne	Directeur de thèse

Remerciements

Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales de l'université Jean Monnet de Saint-Etienne, sous la direction de Jean-Claude Caissard et Sylvie Baudino que je tiens à remercier pour m'avoir accueilli au laboratoire et pour m'avoir donné ma chance.

Un grand merci à Laurent Legendre, directeur du laboratoire, pour m'avoir apporté tous les conseils techniques dont j'avais besoin et surtout pour son soutien moral.

Je souhaite remercier Mohamed Bendahmane et Christiane Gallet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Laurence Hibrand Saint-Oyant et Sandrine Eveillard, qui ont accepté d'en être examinatrices.

Je tiens à remercier également Philippe Hugueney et Christine Miège d'avoir accepté d'être dans mon comité de thèse et je les remercie pour les échanges scientifiques.

J'exprime toute ma gratitude à l'équipe de l'IBCP et de l'ENS et tout spécialement à Michel Becchi, Annie Chaboud, Anne-Marie Thierry et Isabelle Zanella-Cléon qui m'ont permis de réaliser l'extraction et l'identification des protéines. Merci aussi à Nelcy Thazar pour m'avoir gracieusement donné les souches bactériennes construites pour sa propre thèse.

L'analyse des molécules volatiles du parfum n'aurait pas pu se faire sans l'aide précieuse et les conseils de Karine Fattarsi. Un grand merci pour sa patience, les fous rires et les chamailleries scientifiques. Je la remercie également pour cette sincère amitié et le soutien qu'elle m'a apporté.

Pour l'aspect microscopie, je voudrais également remercier Sabine Palle du Centre Stéphanois de Microscopie qui m'a apporté toute l'aide nécessaire à l'obtention de mes résultats.

Au sein du laboratoire, j'adresse mes remerciements à Jean-Louis Magnard, Frédéric Jullien, Sandrine Moja, Florence Nicolé et Florence Gros qui m'ont apporté ponctuellement leur aide au cours de ces années de thèse. Je n'oublie pas tous les stagiaires, notamment Julie et Audrey, qui ont fait partie de la vie du laboratoire.

Une grande pensée à Romain Hecquet et Yann Guitton, thésards colocataires de bureau, qui ont partagé ces années de thèse. Un grand merci pour leur soutien moral, les moments de joie et les galères partagées à la paillasse...bref leur amitié. J'associe Nadine Valot et Sylvain

Legrand, qui m'ont soutenus lors des moments difficiles et également qui m'ont apporté des solutions techniques lors de mes échecs.

Merci à toute l'équipe de l'INRA d'Angers (UMR GenHort) de m'avoir accueilli à plusieurs reprises dans de très bonnes conditions et en particulier un grand merci à Laurence Hibrand Saint-Oyant, Fabrice Fouchet et Tatiana pour tout le travail fourni sur les QTL.

Je remercie encore Sandrine Eveillard de m'avoir donné ma chance lors de mon master 2 et d'avoir cru en moi. Je la remercie pour son amitié et son soutien très précieux à mes yeux.

J'exprime toute ma gratitude à Nicolas, Arahma et les secrétaires qui m'ont apporté un grand réconfort lors de ma thèse.

Je n'oublie pas ma mère, Christian et Edith qui ont toujours cru en moi et qui ont su me redonner confiance lors de mes moments de découragements. Ils m'ont toujours montré le chemin pendant ces 10 ans d'études et sans eux, je ne serai pas arriver à mon objectif. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur. Merci de votre amour.

Une pensée toute particulière à Mykael qui est resté à mes côtés pendant ces cinq longues années difficiles. Il a toujours été présent dans mes grands moments de découragements. Il a su supporter toutes mes mauvaises humeurs avec une grande patience et sans m'en tenir rigueur. Il a été plus qu'un soutien moral pour moi et il s'est également investi à fond dans ma rédaction de thèse. Merci de ton amour et de ta compréhension.

Table des matières

Université Jean Monnet de Saint-Etienne	i
Remerciements	2
Table des matières	4
Table des figures	7
Table des tableaux	11
Abréviations	13
Introduction	14
I. La rose, historique, domestication et amélioration	15
A. Le genre <i>Rosa</i>	15
B. Histoire de la culture des roses	16
C. Cartes génétiques et marqueurs moléculaires	21
II. Utilisations des roses et problèmes liés au parfum	29
A. Les rosiers de jardin et la fleur coupée	29
B. Les roses en parfumerie	30
C. Hypothèses sur l'absence de parfum chez les roses coupées	32
III. Généralités sur la biosynthèse des COV	33
A. Les grandes catégories de COV chez les roses	33
B. Diversité des voies de biosynthèse du 2-phényléthanol	37
IV. Stockage et sécrétion des COV	41
A. Hypothèses sur les mécanismes de sécrétion	41
B. Nature des vésicules lipidiques	46
C. Différents rôles des vésicules lipidiques	51
V. Objectifs de la thèse	55
Matériels et méthodes	58
I. Matériel végétal, souches et plasmides	58
A. Matériel végétal	58
B. Souches bactériennes	61
C. Plasmides	61
II. Techniques d'analyse des COV	63
A. Préparation des échantillons	63
B. Analyse des COV par CPG	64
III. Isolement des vésicules lipidiques	66
A. Extraction et isolement des vésicules lipidiques par gradient de saccharose	66
IV. Analyse des lipides	68
A. Extraction et séparation des lipides en CCM préparative	68
B. Analyse de la composition en CPG-SM	68
C. Activité hydrolytique de la lipase sur les TG	69
V. Analyse protéique des vésicules lipidiques	69
A. Obtention des protéines totales des vésicules	69
B. Electrophorèse des protéines en Nupage® pour analyse protéomique	70
C. Identification des protéines en chromatographie liquide en LC-nano ESI-MS/MS	70
VI. Techniques cytologiques	71
A. Mise en évidence des lipides	71
B. Mise en évidence des terpènes	71
C. Expression transitoire dans les pétales de roses	71
VII. Techniques de biologie moléculaire	72

A.	Extraction d'ARN total de pétales de roses	72
B.	Obtention d'ADN complémentaire	73
C.	Techniques d'amplification d'ADNc par PCR	73
D.	Techniques de clonage	76
VIII.	Analyse informatique et/ou statistique des données	78
Caractérisation des oléosomes de pétales de rose par fractionnement cellulaire : résultats		79
I.	Caractérisation de la fraction lipidique des pétales de rose	79
A.	Etude histochimique sur pétales frais.....	79
B.	Extraction des vésicules lipidiques des pétales	80
C.	Composition lipidique des vésicules de pétales de rose.....	82
II.	Recherche de caractéristiques propres aux d'oléosomes	85
A.	Recherche de marqueurs protéiques.....	85
B.	Expression d'une oléosine exogène	90
III.	Recherche de COV dans les vésicules de pétales de rose.....	92
A.	Recherche d'oléosomes dans des roses non parfumées	93
B.	Recherche de COV dans les oléosomes de pétales de roses parfumées.....	94
Caractérisation des oléosomes de pétales de rose par fractionnement cellulaire : conclusion et discussion		100
I.	Caractérisation de la fraction lipidique des pétales de rose	100
II.	Recherche de marqueurs d'oléosome dans les pétales.....	101
A.	Identification de protéines d'oléosomes par protéomique	101
B.	Expression d'une oléosine exogène : marqueur principal de l'hémi-membrane des oléosomes.....	106
III.	Recherche de COV dans les vésicules de pétales de rose.....	107
A.	Recherche de vésicules contenant des COV dans les roses non parfumées.....	107
B.	Recherche de vésicules contenant des COV dans les roses parfumées.....	107
Etude de la biosynthèse du 2-phényléthanol par une approche génétique : résultats		111
I.	Corrélation entre la production et l'émission du 2-phényléthanol.....	111
A.	Choix de l'organe pour l'étude du 2-phényléthanol.....	111
B.	Choix du stade de développement pour l'étude du 2-phényléthanol	113
C.	Corrélation entre production et émission de COV	115
II.	Etude de l'expression du gène <i>RhPAAS</i> dans la population HW	119
A.	Profils d'expression du gène <i>RhPAAS</i> au stade FE.....	119
B.	Profils d'expression du gène <i>RhPAAS</i> au cours du développement floral.....	122
III.	Etude des différentes copies du gène <i>RhPAAS</i> dans la population HW.....	125
A.	Etude de l'ADN génomique de <i>RhPAAS</i>	125
B.	Expression des allèles selon les individus.....	126
Etude de la biosynthèse du 2-phényléthanol par une approche génétique : conclusion et discussion		128
I.	Corrélation entre la production et l'émission du 2-phényléthanol.....	128
A.	Choix du stade FE de floraison	128
B.	Choix de l'organe de la fleur.....	129
C.	Corrélation entre production et émission du 2-phényléthanol	130
II.	Corrélation entre l'expression du gène <i>RhPAAS</i> au stade BJO et la production de 2-phényléthanol au stade FE.....	131
III.	Corrélation entre l'allèle <i>a1</i> et la production de 2-phényléthanol.....	132
Discussion générale et perspectives		135
I.	Modèle de sécrétion et/ou stockage des COV dans les pétales de roses.....	135
A.	Localisation des enzymes de biosynthèse des COV	135
B.	Stockage des COV et en particulier du 2-phényléthanol	136

C.	Mécanismes de sécrétion des COV	140
II.	Identification et rôle des oléosomes dans les pétales	141
A.	Des oléosomes sans oléosines	141
B.	Rôle des oléosomes dans le trafic des métabolites secondaires et des lipides	142
C.	Rôle des oléosomes dans la sénescence et dans la dégradation des protéines	143
III.	Relations entre les allèles du gène <i>RhPAAS</i>	144
IV.	Conclusion générale	146
	Références bibliographiques	147
	Annexes	170
Annexe 1	Cartes génétiques et marqueurs moléculaires	170
Annexe 2	Solutions pour isoler des vésicules lipidiques par gradient de saccharose 172	
Annexe 3	Solutions utilisées pour l'expression transitoire.....	172
Annexe 4	Solutions de biologie moléculaire	173
Annexe 5	Séquences nucléiques et nucléotidiques de <i>RhPAAS</i>	174

Table des figures

Figure 1 : photographies de quelques roses (d'après HelpMeFind et BotaRosa).	16
Figure 2 : généalogie simplifiée des roses d'après Maïa et Vénard (1976).	19
Figure 3 : carte de liaison de <i>R. x. hybrida</i> 'H190' (A1–A7) et de <i>R. wichuraiana</i> (B1–B7) développée à partir de 91 hybrides. Les SSR-EST sont indiquées en gras et les SSR génomiques sont soulignées. Les marqueurs AFLP ont été précédemment localisés par Crespel et al. en 2002. De part et d'autre de chaque groupe de liaison est indiqué, sur la gauche, les distances en cM et, sur la droite, les loci. Les SSR communs entre les cartes maternelles et paternelles sont liées par des traits en pointillés. Les distorsions sont indiquées avec des astérisques (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) (Hibrand-Saint Oyant et al., 2008).	23
Figure 4 : carte consensus de la rose. Les distances sont exprimées en cM sur la gauche de la carte et les différents marqueurs sont sur la droite. Des gènes sont isolés et cartographiés : RhACS, ACC-synthase; PAR, phenylacetaldehyde reductase; CCD, carotenoid cleavage dioxygenase; RoLHP, TERMINAL FLOWER 2; RoSOC, SUPPRESSOR OF CONSTANS; TPS, terpene synthase; RoLE, LATE EMBRYOGENESIS; RoGA20ox, gibberellic acid 20 oxidase; RGA, resistance gene analogue; Rd1, CAPS marker linked to Rdr1; RoTFL, TERMINAL FLOWER; RcOMT, caVeoyl-o-methyltransferase; RoAP, APETALA; RoGA3ox, gibberellic acid 3 oxidase; RoAXR, AUXIN RESISTANT; B1fa, petal colour; RhAAT, alcohol acyltransferase; gg358-F3H, Xavonol-3-hydroxylase; RhOoMT, orcinol-o-methyltransferase; RhETR, ethylene receptor; SI, self-incompatibility; RoVIP, VERNALIZATION INDEPENDENCE; RoDELLA, repressor of gibberellic acid; RoSPINDLY, SPINDLY; RB, recurrent blooming; B1fo, double flowers; RoGID, GIBBERELLIN INSENSITIVE; RoIAA, INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE; RoCOL, CONSTANS-LIKE; RoFT, FLOWERING LOCUS T; EOMT, eugenolo-methyltransferase; AAT, alcohol acyltransferase; RoGA2, entkaurene synthase; pchcms3, a prunus BAC contig; RGA _b , repressor of Gal-3; RoGA2ox, gibberellic acid 2 oxidase; RhAADC, phenylethanol synthase; GDS, germacrene D synthase; RoGI, GIGANTEA; POMT, phloroglucinol-o-methyltransferase; RoEMF, EMBRYONIC FLOWER; RoSLEEPY, SLEEP; RoLFY, LEAFY. Les positions des QTL sont indiquées pour la résistance au mildiou, le nombre de pétales, les métabolites liés aux parfums, le jour de floraison, les épines et la croissance (Spiller et al., 2010).	25
Figure 5 : carte génétique mâle avec les microsatellites sur le groupe de liaison B6 (logiciel JoinMap 3.0) (Laurence Hibrand Saint-Oyant, non publié). Les distances sont en cM sur le côté gauche. Les individus manquants pour les données du 2-phényléthanol expliquent le décalage de 0,6 cM entre le QTL du 2-phényléthanol (flèche verte) et le gène <i>RhPAAS</i> (flèche rouge). Le QTL a été construit en utilisant le logiciel mapQTL qui a permis d'intégrer les quantités de 2-phényléthanol de la population HW. Ce logiciel a attribué un LOD (logarithme des probabilités) de 13 au QTL du 2-phényléthanol. Dans notre cas, les QTL ayant un score égal ou supérieur à 3 sont considérés comme significatifs.	28
Figure 6 : voie de biosynthèse des trois grandes catégories de COV.	34
Figure 7 : voies de biosynthèse des composés aromatiques chez le pétunia (d'après Boatright et al., 2004). Les flèches noires indiquent des réactions biochimiques vérifiées et les flèches rouges en pointillées indiquent des étapes biochimiques potentielles comprenant plusieurs réactions. PhBSMT : S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid:salicylic acid	

carboxyl methyltransferase, PhBPBT : benzoyl-CoA:benzyl alcohol/phenylethanol benzoyl transferase et PhPAAS : phenylacetaldehyde synthase. Les composés volatils benzénoïdes et phénylpropanoïdes encadrés en bleu sont les composés détectés dans le parfum du pétunia.....	36
Figure 8 : voie de biosynthèse du 2-phényléthanol et de ses dérivés chez la rose (vert) et chez d'autres organismes tels que le pétunia, la tomate et la levure (bleu clair). Deux autres composés émis, le 2-phényléthanol benzoate et le 2-phényléthylacétate, ont été mis en évidence chez le pétunia (bleu foncé).	38
Figure 9 : concentration endogène du méthylbenzoate dans les pétales du pétunia au stade FE et émission du méthylbenzoate (Oyama-Okubo et al., 2005).	43
Figure 10 : micrographies optiques après une coloration avec le réactif de NaDi de cellules de l'épiderme supérieur de pétales de la variété <i>Rosa Generosa</i> 'Sonia Rykiel' Masdogui en A et <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' en B et C, au stade BTO. Flèches rouges, vésicules lipidiques contenant des terpènes. La barre représente une échelle de 10 µm (Bergougnoux et al., 2007).	45
Figure 11 : modèle de formation des oléosomes. TG, triglycérides (d'après Beisson, 1999).	48
Figure 12 : modèle de la conformation de l'oléosine, la caléosine et la stéroléosine à la surface des oléosomes.	49
Figure 13 : variétés de roses hybrides parfumées utilisées pour l'étude des COV dans la fraction vésiculaire. A) 'The Mac Cartney Rose'. B) 'Caprice de Meilland'. C) 'Line Renaud'. D) Gregory Lemarchal'.	58
Figure 14 : variétés de roses non parfumées pour l'étude des COV dans la fraction. A) 'Duett'. B) 'Akito'. C) 'Rose de la Belle'. D) 'Sonrisa'.	59
Figure 15 : différents stades de développement de <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' (d'après Bergougnoux et al., 2007).	61
Figure 16 : carte du vecteur « Gateway » permettant l'expression d'un gène codant pour l'oléosine sous le contrôle d'un promoteur fort 35S (Nelcy Thazar, ENS)	62
Figure 17 : schéma simplifié de l'extraction et de l'isolement des vésicules lipidiques par gradient de saccharose.	67
Figure 18 : carte du vecteur de clonage pGEM-T easy (Promega).	76
Figure 19 : micrographie optique : A) après une coloration avec le réactif de NaDi. La flèche rouge indique une vésicule contenant des terpènes. B) après une coloration au Nile Red. La flèche rouge indique une vésicule lipidique. C) superposition des images A et B. Les colorations sont réalisées sur des pétales de <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. Les barres représentent une échelle de 10µm.	80
Figure 20 : anneau de vésicules obtenu après extraction sur gradient de saccharose.	80
Figure 21 : A) micrographies optiques après coloration avec le réactif de NaDi des vésicules des pétales de <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. La barre représente une échelle de 10 µm. B) Micrographies optiques après coloration avec le réactif de NaDi de la fraction 0,4 M du gradient de saccharose des pétales de <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. Les barres représentent une échelle de 10 µm.	81
Figure 22 : A) micrographie optique du culot des vésicules isolées sur la variété <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' coloré au Nile Red. La barre d'échelle représente 20 µm. B) Micrographie optique de la fraction 0,4 M du gradient de saccharose colorées au Nile Red. Les barres d'échelle représentent 20 µm.	82
Figure 23 : séparation des lipides de la fraction vésiculaire de graines et de pétales par CCM. A droite de la CCM, des standards : monopalmitate, dipalmitate, acide linoléique et trilinoléate. Les pistes 1 et 3 correspondent à la fraction vésiculaire de pétales de <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' respectivement sans et avec lipase. Les pistes 2 et 4 correspondent à la fraction vésiculaire de graines de <i>R. canina</i> respectivement sans et	

avec lipase. Les pistes 5, 6 et 7 correspondent aux standards. La piste 5 correspond à l'action de la lipase sur le trilinoléate de glycéryle.	83
Figure 24 : séparation des protéines de la fraction vésiculaire de pétales de <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' par électrophorèse de type Nupage coloré à l'Instanblue. Les protéines sont déposées dans 5 puits à cause du volume important de l'extrait. L'expérience est réalisée deux fois. L'échelle de poids moléculaire PageRuler (Fermentas), 5 µL.	86
Figure 25 : localisation cellulaire de l'oléosine dans les cellules épidermiques de pétales de roses en microscopie confocale. A-D-G) La première colonne correspond aux pétales colorés au Nile Red. B) pas de construction GFP (contrôle). E) Expression transitoire de la construction témoin 35S:: <i>GFP</i> dans des cellules de pétales de rose. H) Expression transitoire de la construction 35S:: <i>oléosine-GFP</i> . C-F-I) Double marquage Nile Red et GFP. C) Superposition de A et de B. F) Superposition Nile Red et 35S:: <i>GFP</i> . I) Superposition Nile Red et 35S:: <i>oléosine-GFP</i> . Les barres d'échelle représentent une échelle de 10 µm.	91
Figure 26 : A) absence de vésicules après extraction sur gradient de saccharose. B) Présence de vésicules lipidiques chez une rose parfumée.	94
Figure 27 : composés organiques volatils majeurs extraits des vésicules et de la fraction 0,4 M des pétales de roses hybrides parfumées 'Caprice de Meilland' et 'Gregory Lemarchal' au stade FE. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre/g _{PF}	98
Figure 28 : composés organiques volatils majeurs identifiés par extraction dans les différents organes des deux parents <i>R. wichuraiana</i> et <i>R. x hybrida</i> 'H190' au stade FE. La quantité de chaque COV est exprimée en µg/g _{PF}	112
Figure 29 : COV majeurs extraits des pétales des deux parents <i>R. wichuraiana</i> et <i>R. x hybrida</i> 'H190'. Les quantités sont exprimées en µg/g _{PF}	114
Figure 30 : évolution du 2-phényléthanol extrait des pétales au cours du développement floral des deux parents <i>R. wichuraiana</i> et <i>R. x hybrida</i> 'H190'. Les quantités sont exprimées en µg/g _{PF} . Les barres représentent l'écart type.	115
Figure 31 : composés organiques volatils émis par les fleurs analysés en headspace au stade FE sur la population HW. Les quantités sont exprimées en µg/h/g _{PF}	116
Figure 32 : composés organiques volatils produits par les fleurs des deux parents <i>R. wichuraiana</i> et <i>R. x hybrida</i> 'H190' au stade FE. Les quantités sont exprimées en µg/g _{PF} . Cette figure reprend les données de la Figure 28 où les valeurs des trois organes sont additionnées.	117
Figure 33 : RT-PCR semi-quantitative du gène <i>RhPAAS</i> des pétales de roses au stade FE sur une partie de la population HW. Quel que soit le couple d'amorces internes, les résultats obtenus sont identiques, un seul cas est présenté. Les quantités de 2-phényléthanol, extraits des pétales de roses au stade FE sur une partie de la population HW, sont exprimées en µg/g _{PF} . La taille d'un fragment peut être estimée par comparaison avec un standard de taille tel que le marqueur 100pb DNA ladder (Promega). Les tailles obtenues avec les deux couples d'amorces internes sont 800 pb et 1100 pb. La taille obtenue pour <i>RhGAPDH</i> est de 300 pb.	120
Figure 34 : RT-PCR quantitative du gène <i>RhPAAS</i> des pétales de roses sur quelques descendants de la population HW au stade FE. L'ordonnée du graphique est exprimée en ratio d'expression.	121
Figure 35 : RT-PCR semi-quantitative du gène <i>RhPAAS</i> des pétales des deux parents <i>R. wichuraiana</i> et <i>R. x hybrida</i> 'H190' au cours du développement floral. La taille d'un fragment peut être estimée par comparaison avec un standard de taille tel que le marqueur 100pb DNA ladder (Promega). La taille obtenue avec un couple d'amorces internes est 1100 pb. Avec les amorces UTR, la taille obtenue est de 1400 pb.	122

- Figure 36 : RT-PCR quantitative du gène *RhPAAS* des pétales de roses sur une partie de la population HW. Etude des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' sur les quatre stades de développement floral. Ce graphique est zoomé afin de visualiser les ratios de faible expression comparés à celui de RW au stade BJO qui est de 3808. L'ordonnée du graphique est exprimée en ratio d'expression. 123
- Figure 37 : RT-PCR semi-quantitative du gène *RhPAAS* des pétales de roses au stade BJO sur 14 descendants de la population HW. Quel que soit le couple d'amorces internes, les résultats obtenus sont identiques, un seul cas est présenté. Les quantités de 2-phényléthanol extraits des pétales de roses au stade FE sur une partie de la population HW sont exprimées en µg/g_{PF}. La taille d'un fragment peut être estimée par comparaison avec un standard de taille tel que le marqueur 100pb DNA ladder (Promega). La taille obtenue avec un couple d'amorces internes est de 1100 pb. Avec les amorces UTR, la taille obtenue est de 1400 pb. 124
- Figure 38 : schéma récapitulatif de l'expression des différents allèles exprimés chez les parents et les descendants. – représente les individus produisant peu de 2-phényléthanol et + correspond aux individus produisant beaucoup de 2-phényléthanol. 134
- Figure 39 : schéma modèle de la biosynthèse, des possibilités de stockage et de transport des COV dans les cellules épidermiques des pétales de rose. AL : acide linoléique ; LOX : lipoxygénase ; E-2-H : E-2-hexénal ; L-phe : L-phénylalanine ; 2-PE : 2-phényléthanol ; TA : transport actif ; DF : diffusion passive ; CA : composés aromatiques ; AG : acides gras ; GPP : géranyl diphosphate ; GGPP : géranylgéranyl diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; CD4 : caroténoïde 4-dioxygénase ; OOMT : orcino-O-méthyl transférase ; DMT : 3-5 diméthoxytoluène. Il y a trois possibilités de sécrétion. (a) Sécrétion granulocrine : les vésicules lipidiques (oléosomes, plastoglobules) pourraient stocker ou véhiculer les différentes catégories de COV. Ces vésicules contiendraient également les enzymes nécessaires à leur synthèse. (b) Transport actif : il serait envisageable que les COV soient excrétés par des transporteurs ABC. (c) : Diffusion passive : les COV passeraient à travers la membrane plasmique par diffusion passive. 138
- Figure 40 : polymorphisme en SSCP du gène *RhPAAS* (d'après D. Lalanne de l'UMR GenHort, non publié). Des amorces ont été dessinées à partir de la séquence clonée de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' (Kaminaga et al., 2006 ; numéro d'accèsion DQ 192639). Une bande représente le monobrin d'un allèle. Les flèches de couleur rouge indiquent les différents allèles obtenus : a, b et c. Les numéros sont les noms des descendants ; H190 et RW correspondent aux parents *R. x hybrida* 'H190' et *R. wichuraiana*. 170

Table des tableaux

Tableau 1 : composés volatils majeurs identifiés par extraction dans les pétales d'une rose d'origine chinoise <i>R. chinensis</i> 'Old Blush' et d'une rose plus occidentale <i>R. x damascena</i> (d'après Jirovetz et al., 2002).....	20
Tableau 2 : les gènes de la biosynthèse des parfums sont isolés et cartographiés sur la carte consensus de la rose. Les marqueurs SCAR (« Sequence Characterized Amplified Region »), SSCP (« Single strand conformation polymorphism ») et CAPS (« Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ») ont été développés dans la population 94/1 et 97/7 (Spiller et al., 2010).....	25
Tableau 3 : QTL des différents COV localisés sur différents groupes de liaison sur la carte mâle et la carte femelle. Un LOD et un pourcentage d'explication sont attribués pour chaque QTL. Les QTL sont construits en intégrant les quantités de chaque COV sur la population HW en utilisant le logiciel mapQTL. Ce logiciel attribue un LOD (Limit Of Detection) à chaque QTL qui correspond au rapport de probabilité de liaison qui lie les marqueurs moléculaires entre eux. Plus le LOD est important, plus les liaisons sont fiables. Dans notre cas, les QTL ayant un score égal ou supérieur à 3 sont considérés comme significatifs. 94/1- 97-7 sont des roses hybride ' <i>R. x multiflora</i> ' (parents) (Spiller et al., 2010).....	27
Tableau 4 : composés volatils majeurs identifiés par extraction dans les pétales de la variété <i>R. x hybrida</i> 'Papa Meilland' (Bergougnoux et al., 2007) et de <i>R. x damascena</i> (d'après Jirovetz et al., 2002).	31
Tableau 5 : composés volatils du parfum de rose appartenant à trois classes de composés. ...	33
Tableau 6 : caractère lipophile de quelques COV. LogP aussi appelé Log Kow, est une mesure de la solubilité de composés chimiques dans deux solvants (octanol/eau). LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau : $\text{LogP} = \text{Log}(\text{Coct}/\text{Ceau})$. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. Si LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile (http://www.organic-chemistry.org/prog/peo).	37
Tableau 7 : caractères phénotypiques divergents entre les deux parents de la population HW.	60
Tableau 8 : conditions opératoires choisies pour les différentes analyses en CPG-SM : A) pour l'étude des COV extraits des vésicules obtenues par gradient de saccharose. B) pour l'étude des COV extraits des pétales de la population HW. C) pour l'étude de la composition en acides gras des TG extraits des vésicules.	65
Tableau 9 : gammes d'étalonnages ; r ² : coefficient de corrélation ; RSD : Residuel standard deviation ; y : rapport d'étalonnage; x : concentration en mg / L ; a : pente de la droite ; b : bruit de fond de l'appareil.	66
Tableau 10 : couples d'amorces utilisés pour amplifier des fragments d'ADN correspondant au gène <i>RhPAAS</i> . S : amorces sens ; AS : amorces antisens.....	74
Tableau 11 : couples d'amorces utilisés pour amplifier des fragments d'ADN correspondant aux gènes <i>RhPAAS</i> et <i>TCTP</i> . S : amorces sens ; AS : amorces antisens.....	76
Tableau 12 : couples d'amorces utilisés pour vérifier la taille de l'insert <i>RhPAAS</i>	77
Tableau 13 : résultats des Rf des standards de migration sur CCM.....	84

Tableau 14 : composition en acides gras des vésicules de graines et de pétales. La moyenne des trois valeurs obtenues représente les pourcentages de l'aire du pic total des chromatogrammes de CPG-SM. Le pourcentage de l'acide gras est calculé par rapport aux acides gras totaux.	84
Tableau 15 : résultats des protéines séquencées. X : protéine trouvée une seule fois dans les deux protéomes. XX : protéine trouvée dans les deux protéomes réalisés. Le score généré par l'algorithme Paragon du logiciel Protein Pilot permet de hiérarchiser les résultats obtenus en fonction de la précision de mesure, du nombre de peptides matchés et la couverture de séquences. Un score de 2 correspond à 99 % de certitude. VL : vésicules lipidiques animales ou fongiques.	87
Tableau 16 : composés organiques volatils extraits des pétales des variétés de roses non parfumées 'Duett', 'Akito', 'Rose de la Belle', 'Sonrisa' et de la variété parfumée <i>R. x hybrida</i> 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre/g _{PF}	93
Tableau 17 : composés volatils majeurs identifiés par extraction dans les pétales au stade FE des variétés de roses hybrides 'The Mac Cartney Rose', 'Caprice de Meilland', 'Line Renaud', 'Gregory Lemarchal'. La quantité est exprimée en ng équivalent camphre/g _{PF}	95
Tableau 18 : composés organiques volatils identifiés dans le gradient de saccharose. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre.	96
Tableau 19 : COV identifiés dans les vésicules de pétales et dans la fraction 0,4 M pour les quatre variétés de roses hybrides parfumées 'The Mac Cartney Rose', 'Caprice de Meilland', 'Line Renaud' et 'Grégory Lemarchal'. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre/g _{PF} . Un test de χ^2 est réalisé pour les trois répétitions de chaque variété de roses parfumées. La valeur critique du tableau de χ^2 est comparée avec la valeur calculée (valeur calculée > ou < à la valeur critique). - correspond aux COV non détectés dans la fraction.	97
Tableau 20 : comparaison des acides aminés des séquences protéiques déduites des séquences nucléiques de RhPAAS des deux parents <i>R. wichuraiana</i> et <i>R. x hybrida</i> 'H190' à celle de <i>R. x hybrida</i> 'Fragrant Cloud' (Kaminaga et al., 2006); coloré en vert, acides aminés identiques ; coloré en jaune : acides aminés différents.	125
Tableau 21 : expression des allèles du gène <i>RhPAAS</i> chez quelques individus de la population HW au stade BJO et FE. – indique les individus produisant peu de 2-phényléthanol et +, les individus produisant beaucoup de 2-phényléthanol.....	127
Tableau 22 : Comparaison entre le 2-phényléthanol extrait des pétales et les génotypes de <i>RhPAAS</i> observés après analyse du gel sur la population HW (d'après S. Baudino et D. Lalanne, non publié). Les extraits sont analysés en CPG-SM et CPG-FID et les résultats représentent la moyenne de la quantité du 2-phényléthanol produit, exprimée pA*s, obtenus sur deux années consécutives. L'écart-type du 2-phényléthanol produit représente l'erreur standard.	170

Abréviations

AAT	Alcool acyltransférase
AADC	Acide aminé aromatique décarboxylase
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
BJO	Bouton juste ouvert
BO	Bouton ouvert
CCM	Chromatographie sur couche mince
COV	Composés organiques volatils
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DAG	Diglycérides
DIF	Détecteur à ionisation de flamme
DMT	3,5-diméthoxytoluène
FE	Fleur épanouie
FS	Fleur sénescence
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP	Green fluorescent protein
IPP	Isopentényl diphosphate
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranoside
LB	Luria Bertani
LC- ESI-MS/MS	Chromatographie liquide en ionisation par electrospray couplé au spectre de masse
MAO	Monoamine oxidase
MEP	2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate
MEV	Mévalonate
NSDHL	NAD(P)H steroid dehydrogenase-like
OOMT	Orcinol-O- méthyltransférase
PAAS	Phénylacétaldéhyde synthase
PAP	Plastid lipid-associated protein
PF	Poids frais
PhBPBT	Benzoyl CoA:benzyl alcohol/phenylethanolbenzoyltransferase de pétunia
PL	Phospholipides
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
RE	Réticulum endoplasmique
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RW	<i>Rosa wichuraiana</i>
RhPAAS	Phénylacétaldéhyde synthase de rose
TCTP	Translationally controlled Tumor Protein
TG	Triglycérides
SM	Spectroscopie de masse
SSCP	Single strand conformation polymorphism
SSR	Single sequence repeat
TMB	1,3,5-triméthoxybenzène

Introduction

La rose est cultivée depuis l'antiquité pour ses qualités esthétiques et pour son parfum. Au XIX^{ème} et XX^{ème} siècle, les obtenteurs ont beaucoup travaillé les croisements et la sélection afin d'obtenir, par exemple, des roses à plus de 100 pétales, très parfumées, à floraison abondante et permanente durant toute la belle saison. Malheureusement, dans certains cas, les sélectionneurs ont perdu le caractère parfumé sans raison connue et il n'est pas rare de porter un bouquet au nez et d'être déçu.

C'est dans ce contexte que se situent les recherches du laboratoire BVpam et c'est dans ce contexte qu'a débuté ma thèse. Avant mon arrivée, plusieurs hypothèses avaient été testées au laboratoire pour expliquer l'absence d'odeur chez certaines variétés de roses : épaisseur de la cuticule, quantité d'amidon, fonctionnement de quelques gènes des voies de biosynthèse. Mon travail de thèse a alors débuté avec deux aspects : mécanismes de sécrétion des composés volatils et fonctionnement des allèles du gène codant pour la phénylacétaldéhyde synthase (*RhPAAS*). Dans la 1^{ère} partie de ma thèse, j'ai donc cherché à mieux comprendre la façon dont des composés lipophiles peuvent voyager dans un cytosol aqueux. Ce domaine de recherche est quasiment vierge et l'hypothèse qui a été faite au départ est que ce type de composés doit se retrouver dans des organites spécialisés dans la compartimentation des lipides, à savoir les oléosomes. Quelques indices bibliographiques nous ont en effet permis de supposer que ces organites existent bien dans les pétales. Dans la 2^{nde} partie de ma thèse, nous avons saisi l'opportunité d'un croisement réalisé à l'INRA d'Antibes (Crespel et al., 2002). Des travaux préliminaires de cartographies QTL et de rapports mendéliens sur la présence ou l'absence de 2-phényléthanol avaient en effet permis de supposer que le gène *RhPAAS* n'exprime que deux allèles dans cette population. Un tel ratio est rare pour les parfums ; les sélectionneurs affirment souvent qu'un croisement entre deux roses parfumées ne donne que 10% de descendants parfumés. Nous avons donc entrepris de mieux comprendre le fonctionnement de ce gène. Mon mémoire sera donc articulé autour de ces deux points : mécanismes de sécrétion et/ou de stockage des parfums et étude de l'expression des allèles de *RhPAAS*.

I. La rose, historique, domestication et amélioration

A. Le genre *Rosa*

Le rosier (*Rosa* sp.) est une angiosperme dicotylédone appartenant à l'ordre des Rosales et à la famille des Rosacées. Cette dernière comprend de nombreux genres incluant une multitude d'espèces fruitières (*Malus* sp., *Pyrus* sp., *Fragaria* sp.), ornementales (*Potentilla* sp.) et forestières (*Rubus* sp.). D'un point de vue botanique, la classification des rosiers est complexe car elle résulte de nombreuses observations morphologiques, génétiques et moléculaires. Ainsi, c'est la classification de Rehder (1947) qui s'impose aujourd'hui. Le genre *Rosa* est répartie sur tout l'hémisphère Nord et se compose de quatre sous-genres : Le sous-genre *Hesperhodos* se limite à deux espèces à floraison remontante confinées dans le Sud-Ouest des Etats Unis. Le sous-genre *Platyrhodon* est originaire du Sud-Est de la Chine incluant *Rosa roxburghii*, dit rosier châtaigne dû à la forme de son fruit. Le sous-genre *Hulthemia* est originaire d'Asie mineure incluant notamment deux espèces, *Rosa persica* et *R. x hardii*. Le quatrième sous-genre *Eurosa* est divisé en dix sections et compte cent quinze espèces. Les représentants de ce sous-genre sont par exemple, *Rosa canina*, *R. x damascena*, *R. multiflora*, *R. chinensis* et *R. gigantea*.

Le genre *Rosa* présente une grande variété phénotypique (Figure 1). En effet, ce sont des arbustes vivaces buissonnants ou sarmenteux, semi-persistants ou caducs. Les tiges sont arquées, sarmenteuses couvre sol ou sarmenteuses grimpantes, souvent munies d'aiguillons ou d'épines (Brickell et Mioulaine, 2002). On dénombre huit grandes formes de fleurs de rosiers. Les principales sont arrondies, à cœur turbiné, urcéolées et en rosette (Brickell et Mioulaine, 2002). Chez les rosiers botaniques ou sauvages, les fleurs sont essentiellement simples, à cinq pétales et cinq sépales situés sous la corolle. Les rosiers modernes sont généralement constitués d'au moins une dizaine de pétales. La remontance, qui correspond à la capacité d'un rosier à fleurir de manière récurrente de mai à novembre, constitue un caractère phénotypique important. A l'inverse, la non remontance rencontrée chez les roses botaniques telles que *R. canina* connue sous le nom d'églantier, se caractérise par une seule vague de floraison à la période reproductive.



Figure 1 : photographies de quelques roses (d'après HelpMeFind et BotaRosa).

Ce genre possède un petit génome, environ 560 Mpb, soit environ quatre fois le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Son nombre de chromosome de base est égal à sept. Le rosier constitue un matériel difficile pour les études génétiques et cela pour de nombreuses raisons. En effet, le rosier est fortement hétérozygote (Gudin et Mouchotte, 1996). Son niveau de ploïdie est élevé et variable (Jacob et al., 1996). De nombreux rosiers sauvages (*Rosa moschata* Herrmann), sont diploïdes ($2n=2x=14$) alors que le rosier cultivé est principalement tétraploïde ($2n=4x=28$) (*R. gallica*, *R. x damascena* Miller, *R. x centifolia*), pentaploïdie (*R. canina*) ou hexaploïde (*R. x alba* ; Dirlwanger et al., 2002).

B. Histoire de la culture des roses

Le genre *Rosa* est apparu à l'ère tertiaire. Les premières espèces sont apparues dans l'hémisphère nord il y a environ 35 millions d'années (Weiss, 1997). Une fresque, datant probablement du XVIII^{ème} siècle avant JC, retrouvée à Knossos, en Crète, serait la plus vieille représentation d'une rose. Les roses étaient déjà utilisées dans l'antiquité et de nombreuses informations sont fournies par les écrits de l'historien grec Hérodote (de 490 à 420 av. JC), du philosophe grec Théophraste (de 372 à 287 av. JC) et de l'écrivain et naturaliste romain Plinius

l'ancien (de 23 à 79 av. JC ; Testu, 1984). Ce dernier rapporte que les Romains cultivaient les roses sous des serres chauffées en hiver par de l'eau chaude (Testu, 1984).

L'Asie est une aire d'origine importante pour le rosier, et c'est là-bas que leur culture a commencé il y a environ 5000 ans, probablement en Chine. On y trouve par exemple *R. gigantea* et *R. chinensis*. C'est d'ailleurs au sein de l'espèce *R. chinensis* que l'on trouve le caractère de remontance. *R. x damascena*, réputée pour son parfum, est originaire de Perse.

L'introduction des roses d'Asie, en Europe, s'est étalée sur une longue période. En effet, pendant la période romaine (de 30 av. JC à 312 ap. JC), ces rosiers d'Asie étaient cultivés au Moyen-Orient, ce qui favorisa l'introduction de ces roses au Proche Orient et en Europe. La première rose chinoise à avoir été implantée en Europe est *R. chinensis* 'Old Blush'. Il faudra attendre les croisades (du XI^{ème} au XIII^{ème} siècle) pour que les voyageurs rapportent du Proche-Orient des variétés d'Asie telles que *R. x damascena*, *R. x centifolia* et *R. x alba*, inconnues jusqu'alors en Europe.

En Europe, au XIII^{ème} siècle, la plupart des roses appartenaient au groupe des rosiers galloques d'origine européenne, qui sont rustiques, résistants au froid, bien parfumés, non remontants et de multiplication facile par bouturage. A cette époque, la culture du rosier débute en France, sur le pourtour méditerranéen, avec des roses comme *R. gallica* 'officinalis' (rose des apothicaires).

Vers le début du XIX^{ème} siècle, des hybrideurs, français pour la plupart, entreprirent des croisements contrôlés, développant de façon considérable le nombre de variétés disponibles. Les rosiers modernes sont obtenus par des croisements résultant de combinaisons successives entre des espèces sauvages, asiatiques ou européennes (Figure 2). Chacune d'entre elles a apporté un ou plusieurs caractères remarquables dont celui du parfum. Certaines variétés chinoises comme *R. chinensis* 'Old Blush' ont une fragrance florale constituée majoritairement de 1,3,5-triméthoxybenzène ou TMB qui est un composé aromatique. Leur fragrance est qualifiée d'odeur de thé. Les roses européennes comme *R. x damascena*, ayant une odeur de rose typique, renferment une grande quantité d'alcools monoterpéniques et de 2-phényléthanol. A titre d'exemple, le Tableau 1 présente les principaux composés des pétales de roses d'origine chinoise et européenne. A tous les stades de la domestication, le parfum a constitué un caractère extrêmement important chez les roses cultivées. Cette période marque donc l'arrivée en Europe des rosiers modernes, considérés comme des espèces artificielles. Ces obtenteurs vont exploiter avec succès les multiples croisements qui font apparaître de

nouvelles variétés constituées d'une grande diversité de fragrances. Un groupe horticole nommé rosiers Noisette, du nom de leur obtenteur, est issu d'un croisement de *R. moschata* par *R. chinensis* 'Old Blush', avec par exemple 'Champneys' Pink Cluster' (1802), 'Blush Noisette' (1814) et 'Rêve d'Or' (1868). Les rosiers de l'Île Bourbon sont aussi un groupe de roses parfumées. La ressource originelle apparue dans l'île de la Réunion provient d'une hybridation interspécifique naturelle entre *R. x damascena* et *R. chinensis* 'Old Blush'. 'Reine des Îles Bourbon' (1834), 'Souvenir de la Malmaison' (1843) peuvent être cités comme exemple. Les rosiers Portland sont encore un groupe de roses parfumées, dont l'origine repose sur trois patrimoines botaniques complexes : *R. gallica*, *Rosa x damascena bifera* et *R. semperflorens*. On y trouve par exemple, la 'Rose du Roi' (1819), 'Comte de Chambord' (1860) et 'Jacques Cartier' (1868). Enfin, durant ce processus de domestication et de sélection de nouvelles variétés, deux groupes à l'origine des roses modernes ont été obtenus. Il s'agit des Hybrides Remontants et du groupe Thé. Les rosiers Hybrides Remontants ont initialement été obtenus par croisement entre des Portland et des hybrides de Chine. On y trouve par exemple 'Jules Margottin' (1853), 'Général Jacqueminot' (1853) et 'Reine des Violettes' (1860). Les rosiers Thé ont été initiés par de multiples croisements entre les roses d'Asie et les roses d'Europe. Ils vont emprunter aux génomes de *R. chinensis* 'Old Blush', *R. sulfurea* et *R. odorata* pour le patrimoine "chinois", ainsi qu'à ceux des génomes de *R. moschata* et *R. damascena* pour le patrimoine européen. En 1867, le rosiériste Jean-Baptiste Guillot propose un nouveau rosier nommé 'La France'. C'est le premier d'une longue lignée de rosiers nommés 'Hybride de Thé', issus de croisements entre des hybrides remontants et des rosiers Thé. Les rosiers obtenus possèdent le caractère de floraison continue et parfois le parfum de thé des roses de Chine, associés à la rusticité et à la résistance au froid des roses européennes (Maia et Venard, 1976). Chez ces roses modernes, les parfums sont très variés et s'écartent bien souvent de ce que l'on considère comme le parfum de rose typique. Leur parfum est riche en composés phénoliques volatils comme le 3,5-diméthoxytoluène ou DMT, dont la fragrance subtile rappelle celle du thé. Les représentants de ces Hybrides de Thé sont notamment *Rosa x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' et *R. x hybrida* 'Caprice de Meilland'. *R. hybrida* 'Lady Hillingdon' a hérité de ce parfum de type chinois avec 70 % de DMT.

Tableau 1 : composés volatils majeurs identifiés par extraction dans les pétales d'une rose d'origine chinoise *R. chinensis* 'Old Blush' et d'une rose plus occidentale *R. x damascena* (d'après Jirovetz et al., 2002).

Composés	<i>R. x damascena</i>	<i>R. x chinensis</i> 'Old Blush'
α -pinène	X	
β -caryophyllène	X	
β -ionone	X	
β -myrcène	X	X
β -pinène		X
Citronellal	X	
Citronellol	X	
Citronellyl acétate		X
Dihydro- β -ionol		X
E-3-hexénol	X	X
E-3-hexényl-acétate		X
E-rose oxyde	X	
Géranial	X	X
Géraniol	X	X
Géranyl acétate	X	
Germacrène D		X
Linalol	X	
Méthyleugénol	X	
Nérol	X	
Nonadécane		X
TMB		X
Z- β -damascénone	X	
Z-2-hexénal		X
2-phényléthanol	X	

La popularité de la rose en tant que plante horticole a vraiment pris son essor au XIX^{ème} siècle et s'est encore amplifiée au XX^{ème} siècle. La rose devient alors un produit de masse dans le domaine des fleurs coupées. Aujourd'hui, les Français occupent la première place des créateurs de rose grâce à Meilland, Delbard et Guyot, mondialement connus. Ces obtenteurs multiplient toujours les croisements pour créer de nouvelles variétés. En effet, ils doivent offrir régulièrement de la nouveauté en renouvelant leurs gammes et, en particulier, en proposant régulièrement soit des roses à odeur typique très forte soit des roses à nouvelle odeur.

C. Cartes génétiques et marqueurs moléculaires

Actuellement, plusieurs cartes génétiques du rosier sont publiées et mettent en jeu différents génotypes (*R. multiflora*, *R. wichuraiana*, *R. rugosa* et *R. x hybrida*). La carte génétique de Rajapakse et al. publiée en 2001 a été réalisée à partir d'un croisement entre des rosiers tétraploïdes. D'autres cartes ont été effectuées sur des populations F1 obtenues à partir de croisements entre rosiers diploïdes (Debener et al., 1999 ; Crespel et al., 2002 ; Yan et al., 2005). Sur ces cartes, des gènes majeurs et des QTL (« Quantitative Trait Loci ») ont été localisés, gouvernant différents caractères à savoir : la couleur et la duplication de la fleur (Debener et Mattiesch, 1999), la remontance (Crespel et al., 2002), la résistance aux taches noires et à l'oïdium (Malek et al., 2000), la taille des feuilles (Dugo et al., 2005), les aiguillons (Rajapakse et al. 2001) et plus récemment le nombre de pétales et la date de floraison (Hibrand-Saint Oyant et al., 2008). Les premières cartes génétiques séparées mâle/femelle par double pseudo-test cross (Grattapaglia et Sederoff, 1994) ont été construites à partir de marqueurs RAPD et AFLP (« Random Amplified Polymorphism DNA » ; « Amplified Fragment Length Polymorphism » ; Debener et al., 1999 ; Rajapaske et al., 2001 ; Crespel et al., 2002). De nombreux SSR (« Simple Sequence Repeats ») ont été ensuite développés sur des populations diploïdes et tétraploïdes (Yan et al., 2005, Hibrand-Saint Oyant et al., 2008) permettant l'intégration de cartes séparées. Aujourd'hui, grâce aux marqueurs disponibles et aux différentes populations, une carte consensus est développée (Spiller et al, communication personnelle).

Sur la population nommée HW, qui provient du croisement de *R. x hybrida* 'H190' (parent femelle) et *R. wichuraiana* (parent mâle), une carte génétique a été construite tout d'abord à l'aide de marqueurs AFLP (Crespel et al., 2002) puis enrichie par des marqueurs SSR (Hibrand-Saint Oyant et al., 2008) (Figure 3). Actuellement, la carte maternelle *R. x hybrida* 'H190' montre sept groupes de liaisons de cent cinq marqueurs couvrant 432 cM et cent trente six marqueurs couvrants 438 cM pour la carte paternelle *R. wichuraiana*. La plupart des gènes ou des QTL localisés sur ces deux cartes concernent essentiellement des caractères liés à la floraison du rosier.



Figure 3 : carte de liaison de *R. x. hybrida* 'H190' (A1-A7) et de *R. wichuraiana* (B1-B7) développée à partir de 91 hybrides. Les SSR-EST sont indiquées en gras et les SSR génomiques sont soulignées. Les marqueurs AFLP ont été précédemment localisés par Crespel et al. en 2002. De part et d'autre de chaque groupe de liaison est indiqué, sur la gauche, les distances en cM et, sur la droite, les loci. Les SSR communs entre les cartes maternelles et paternelles sont liés par des traits en pointillés. Les distorsions sont indiquées avec des astérisques (** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$, ***** $p < 0.0001$) (Hibbrand-Saint Oyant et al., 2008).

Récemment une étude menée sur une population issue d'un croisement entre *R. multiflora* et un génotype non déterminé a permis de localiser sept QTL influençant la quantité des COV chez la descendance tels que le géranyl acétate, le néryl acétate, le nérol, le β -citronellol, le géraniol (Figure 4 et Tableau 3). Deux QTL ont été positionnés expliquant des variations de quantité de 2-phényléthanol. L'un, situé sur le groupe de liaison LG5 avec un LOD de 10, expliquant 60 % de la variation phénotypique, est proche du gène *RhAADC* cloné par Sakai et al. (2007) dont le produit catalyse une des étapes de biosynthèse du 2-phényléthanol. L'autre, situé sur le groupe de liaison LG2 avec un LOD de 4, expliquant 28 % de la variation phénotypique, est proche du gène *RhAAT1* cloné par Guterman et al. (2002) dont le produit a pour rôle de rajouter un groupement acétate sur le 2-phényléthanol (Spiller et al., 2010) (Figure 4). D'autres gènes liés à la production de parfum ont été également cartographiés sur la population 94/1 et 97/7 (Tableau 2).



Figure 4 : carte consensus de la rose. Les distances sont exprimées en cM sur la gauche de la carte et les différents marqueurs sont sur la droite. Des gènes sont isolés et cartographiés : RhACS, ACC-synthase; PAR, phenylacetaldehyde reductase; CCD, carotenoid cleavage dioxygenase; RoLHP, TERMINAL FLOWER 2; RoSOC, SUPPRESSOR OF CONSTANS; TPS, terpene synthase; RoLE, LATE EMBRYOGENESIS; RoGA20ox, gibberellic acid 20 oxidase; RGA, resistance gene analogue; Rd1, CAPS marker linked to Rdr1; RoTFL, TERMINAL FLOWER; RcOMT, caVeoyl-o-methyltransferase; RoAP, APETALA; RoGA3ox, gibberellic acid 3 oxidase; RoAXR, AUXIN RESISTANT; Blfa, petal colour; RhAAT, alcohol acyltransferase; gg358-F3H, Xavonol-3-hydroxylase ; RhOOMT, orcinol-o-methyltransferase; RhETR, ethylene receptor; SI, self-incompatibility; RoVIP, VERNALIZATION INDEPENDENCE; RoDELLA, repressor of gibberellic acid; RoSPINDLY, SPINDLY; RB, recurrent blooming ; Blfo, double flowers; RoGID, GIBBERELLIN INSENSITIVE; RoIAA, INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE; RoCOL, CONSTANS-LIKE; RoFT, FLOWERING LOCUS T; EOMT, eugenolo-methyltransferase; AAT, alcohol acyltransferase; RoGA2, entkaurene synthase; pchcms3, a prunus BAC contig; RGAb, repressor of Ga1-3; RoGA2ox, gibberellic acid 2 oxidase; RhAADC, phenylethanol synthase; GDS, germacrene D synthase; RoGI, GIGANTEA; POMT, phloroglucinol-o-methyltransferase; RoEMF, EMBRYONIC FLOWER; RoSLEEPY, SLEEP; RoLFY, LEAFY. Les positions des QTL sont indiquées pour la résistance au mildiou, le nombre de pétales, les métabolites liés aux parfums, le jour de floraison, les épines et la croissance (Spiller et al., 2010).

Tableau 2 : les gènes de la biosynthèse des parfums sont isolés et cartographiés sur la carte consensus de la rose. Les marqueurs SCAR (« Sequence Characterized Amplified Region »), SSCP (« Single strand conformation polymorphism ») et CAPS (« Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ») ont été développés dans la population 94/1 et 97/7 (Spiller et al., 2010).

Gènes	Nom du marqueur	Type du marqueur	Population	Groupe de liaison
Alcohol acyltransferase1	RhAAT1-Intron, RhAAT1codingseq	SCAR	94/1, 97/7	2
Germacrene D-synthase	GDS-1, GDS-2	SSCP	94/1, 97/7	5
Orcinol-O-methyltransferase	RhOOMT1 and -2	CAPS	94/1	2
Eugenol-O-methyltransferase	EOMT_MboI	SSCP	97/7	4
Caffeic acid-O-methyltransferase3	RcOMT3-265 and -280	SCAR	94/1, 97/7	2, 4

Gènes	Nom du marqueur	Type du marqueur	Population	Groupe de liaison
Phloroglucinol-O-methyltransferase	POMT_MboI	CAPS	97/7	6
Carotenoid cleavage dioxygenase	CCD1_RsaI	CAPS		1
Terpene synthase-like (Farnesyltransferase)	T_1410_TPS-L	CAPS	94/1	4
Phenylacetaldehyde reductase	c3299-1, -2, -3_PAR-L	CAPS	94/1	1
BEAT-like	T_178_BEAT-L	SSCP	94/1	2
N-methyltransferase	G_189_NMT-L	CAPS	97/7	2
Terpene synthase-like	T_1994_TPS-	SSCP	94/1	1
Alcohol acetyltransferase-like	T_45_AAT-L	SSCP	97/7	4
Benzyl alcohol acetyltransferase-like	T_81_BEAT-L	SSCP	97/7	6
Terpene synthase	c125_TPS_L	SSCP	94/1	5

Des travaux préliminaires menés par l'UMR GenHort (L. Hibrand-Saint Oyant, F. Foucher, S. Baudino, J.-C. Caissard, Comm. Pers.) ont permis d'identifier des QTL gouvernants les différents parfums trouvés sur différents groupes de liaison (Tableau 3). Sur la carte femelle H190, seuls les dérivés d'acides gras odorants sont localisés sur les chromosomes. L'héxanal et les isomères de l'héxanol sont positionnés sur le même groupe de liaison A3 alors que le pentanal et le nonanal sont localisés respectivement sur le groupe de liaison A1 et A6. Pour la carte mâle RW, 10 QTL sont trouvés dont les isomères du farnésol qui sont positionnés sur le groupe de liaison B5. Sur le groupe de liaison B6, de nombreux COV appartenant aux terpènes (germacrène D), aux composés aromatiques (DMT) et aux dérivés des acides gras (nonénal) sont localisés. L'ensemble des QTL détectés dans cette étude explique une variation phénotypique entre 16 et 37 %. Ils ont permis également de montrer que le QTL majeur expliquant la présence de 2-phényléthanol chez *R. wichuraiana* est localisé sur le même locus dans le groupe de liaison B6 avec un LOD de 16. Cependant, ce groupe de liaison ne correspond pas aux groupes LG5 ou LG2 de Spiller et al. (2010).

Tableau 3 : QTL des différents COV localisés sur différents groupes de liaison sur la carte mâle et la carte femelle. Un LOD et un pourcentage d'explication sont attribués pour chaque QTL. Les QTL sont construits en intégrant les quantités de chaque COV sur la population HW en utilisant le logiciel mapQTL. Ce logiciel attribue un LOD (Limit Of Detection) à chaque QTL qui correspond au rapport de probabilité de liaison qui lie les marqueurs moléculaires entre eux. Plus le LOD est important, plus les liaisons sont fiables. Dans notre cas, les QTL ayant un score égal ou supérieur à 3 sont considérés comme significatifs. 94/1- 97-7 sont des roses hybride '*R. x multiflora*' (parents) (Spiller et al., 2010).

	94/1 - 97/7	RW	H190	LOD	% explication
Géraniol	LG1				23
2-phényléthanol	LG2-LG5			4 et 10	28 et 60
		LG6 (B6)		16	62
Nérol	LG3				
β-citronellol	LG7-LG1				15
Géranyl acétate	LG2				
Néryl acétate	LG4				
Pentanal			A1	3,6	22,6
Hexanal			A3	7,5	35,8
E-2-hexenal			A3	5,31	29,9
Z-3-hexénol			A3	5,91	37,3
Nonanal			A6	3,68	22,56
E-2-hexénol			A3	8,18	38,3
Z-β-farnésène		B5		2,82	16,1
EE-farnésène		B5		3,08	18,3
Germacrène D		B6		4,13	21,7
DMT		B6		5,43	27,5
Benzylalcool		B6		3,94	20,8
Hexyl acétate		B6		2,64	16,5
E-2-nonénal		B2		2,45	16,5
E-farnésal		B5		3,09	17,7
Farnésol		B5		4,77	24,6

Pour cartographier le gène *RhPAAS*, impliqué dans la voie de biosynthèse du 2-phényléthanol, sur la carte génétique des parents mâle et femelle, la population HW a été testée en SSCP (« Single Strand Conformation Polymorphism ») (Annexe 1). Chez la femelle *R. x hybrida* 'H190', le gène *RhPAAS* s'est avéré monomorphe de type c/c tandis que chez *R. wichuraiana*, *RhPAAS* a présenté un polymorphisme de type a/b. Deux génotypes ont alors été possibles chez les quatre-vingt-neuf descendants : a/c ou b/c en proportion équivalente (χ^2 de 1,36). Les différents génotypes sur les descendants de la population en ségrégation ont permis de localiser le gène *RhPAAS* sur le groupe de liaison B6 de la carte mâle. Une corrélation a été

établie sur la population HW entre le génotype et le phénotype concernant la quantité de 2-phényléthanol. En effet, tous les individus ne produisant pas ou peu de 2-phényléthanol ont un génotype a/b et tous les individus produisant beaucoup de 2-phényléthanol ont un génotype a/c (Annexe 1). Ainsi, le QTL majeur expliquant la présence de 2-phényléthanol chez *R. wichuraiana* et le gène *RhPAAS* sont localisés sur le même locus dans le groupe de liaison B6 (Figure 5).

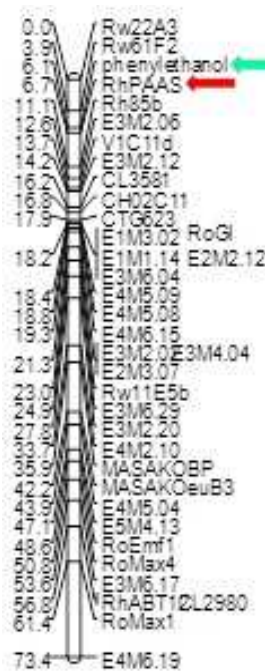


Figure 5 : carte génétique mâle avec les microsatellites sur le groupe de liaison B6 (logiciel JoinMap 3.0) (Laurence Hibrand Saint-Oyant, non publié). Les distances sont en cM sur le côté gauche. Les individus manquants pour les données du 2-phényléthanol expliquent le décalage de 0,6 cM entre le QTL du 2-phényléthanol (flèche verte) et le gène *RhPAAS* (flèche rouge). Le QTL a été construit en utilisant le logiciel mapQTL qui a permis d'intégrer les quantités de 2-phényléthanol de la population HW. Ce logiciel a attribué un LOD (logarithme des probabilités) de 13 au QTL du 2-phényléthanol. Dans notre cas, les QTL ayant un score égal ou supérieur à 3 sont considérés comme significatifs.

II. Utilisations des roses et problèmes liés au parfum

La rose est la fleur la plus répandue dans le domaine de l'horticulture. Elle est la première plante d'ornement en Europe et vraisemblablement dans le monde entier. De ce fait, aujourd'hui la culture s'est industrialisée et l'essor des transports a permis de la délocaliser dans des pays à faible coût de main d'œuvre comme le Kenya où les roses sont calibrées, emballées, expédiées et proposées à la vente en moins de 24 heures. La rose est présente dans trois secteurs d'activités : la fleur de jardin, la fleur coupée, et la parfumerie.

A. Les rosiers de jardin et la fleur coupée

De par le monde, on estime que, chaque année, 150 millions de plants de rosiers sont achetés. La production européenne, dépassant 100 millions de plantes, est assurée en partie par les pays de l'Europe de l'Est. La production française de rosiers de jardin, estimée à plus de 15 millions de plantes, soit 1000 variétés, est répartie dans trois grandes régions (Delbard, 2002) : la région Provence-Alpes-Côte d'Azur, la région Ouest, et l'Anjou, le premier producteur européen. Avec 7 millions de rosiers vendus par an, Doué la Fontaine est le pôle représentatif de cette région. L'achat des rosiers de jardins et de rosiers miniatures représente 40 % du total d'achat des plantes ornementales. Les roses sont sélectionnées pour leurs ports, leurs beautés, leurs formes, leurs résistances aux maladies et également leurs parfums. De nouvelles couleurs de pétales et des parfums originaux sont aussi très recherchés.

Sur la totalité des surfaces dévolues à la culture des fleurs coupées, 25 % sont occupées par les roses (Delbard, 2002). Aujourd'hui, les roses coupées sont principalement produites en Hollande pour 40 %, en Amérique latine pour 30 % (Colombie, Equateur et Mexique) et en Afrique de l'Est pour 15 % (Kenya, Zimbabwe, Tanzanie, Ouganda et Ethiopie). Pour l'année 2003, la production mondiale cultivée sous abris est estimée à plus de 15 milliards de tiges (Blom et Tsuijita, 2003). En France, la région la plus productrice est le Var avec 38 %. Plus de 218 millions de roses en fleurs coupées ont été mises en vente en 2004 par un millier de producteurs français. La résistance au conditionnement et au transport, la bonne longévité en vase, l'esthétique, la croissance rapide, la floraison abondante en toutes saisons sont quelques exemples de critères développés, à des fins commerciales, pour de nouvelles variétés de roses

(Meynet, 2001). Beaucoup de ces roses sont quasiment dépourvues de parfum (Gudin, 1995) car ce critère a rarement été pris en compte pour la sélection. Sur le plan économique, le commerce de la rose coupée l'emporte aujourd'hui nettement sur ses usages en parfumerie et en produits dérivés.

B. Les roses en parfumerie

Les roses européennes, ayant une odeur de rose classique, notamment *R. x damascena* et *R. x centifolia*, sont utilisées pour l'industrie du parfum, et de façon intensive pour la production d'huile essentielle et d'absolu, produits parfumés extraits des pétales. Des surfaces importantes sont dévolues à la culture de ces dernières en Bulgarie, au Maroc et en Tunisie. En France, et plus précisément à Grasse, capitale mondiale de la parfumerie, des parfums de luxe comme le numéro 5 de Chanel sont produits à partir de *R. x centifolia*. Le plus célèbre parfum à base de roses reste Joy de Jean Patou (1935) qui a été qualifié de "parfum le plus cher au monde" et figure toujours parmi les cinq plus grands parfums du monde. Plus récemment, d'autres parfums à base de roses sont commercialisés comme Jardins de Bagatelle de Guerlain (1986), Trésor de Lancôme (1990), ou encore l'Eau d'Eden de Cacharel (1996).

A partir des roses, plusieurs produits peuvent être extraits. L'eau de rose s'obtient par distillation de fleurs entières et contient des composés comme le 2-phényléthanol grâce à leur hydrosolubilité. L'huile essentielle est récupérée par le même procédé mais nécessite une grande quantité de matière première puisqu'il faut environ 3 tonnes de roses pour en obtenir 1 kg. Ce ratio permet de justifier un prix élevé allant de 2000 à 7000 €/kg (Schulz, 2003). Au XIX^{ème} siècle, l'extraction par solvant volatil a été mise au point pour remplacer l'hydrodistillation qui ne donne pas de bons résultats avec la rose. Ainsi, l'extraction de pétales ou de fleurs entières par l'hexane permet d'obtenir une pâte odorante nommée la concrète. Le solvant est totalement éliminé par filtration. L'absolu de rose est extrait à partir de concrète solubilisée par de l'alcool. Le mélange est alors refroidi pour précipiter les cires, qui seront éliminées par filtration. Il ne reste plus qu'à évaporer l'alcool sous vide. Un kg de concrète ou 0,5 kg d'absolu nécessite approximativement 400 kg de roses (Weiss, 1997). L'huile essentielle de rose, l'absolu et la concrète sont utilisés pour les produits cosmétiques et les parfums dans différentes régions telles que l'Europe, le Japon et les Etats-Unis. L'eau de rose est utilisée en phytothérapie pour traiter la fièvre, les nausées, les migraines, les otites et la nervosité.

Le mélange complexe de composés odorants est unique pour chaque variété de rose (Tableau 4). Le pétale étant l'organe renfermant le plus de fragrance, l'augmentation du caractère parfumé est amené par la duplication de la fleur. Par exemple, *R. gallica* 'officinalis', fleur double possédant plus de dix pétales, est plus parfumée que les roses botaniques à fleurs simples constituées de cinq pétales comme *R. canina* (Özel et Clifford, 2004), *R. chinensis* (Joichi et al., 2005) et *R. rugosa* (Dobson et al., 1990 ; Dobson et al., 1999) par exemple.

Tableau 4 : composés volatils majeurs identifiés par extraction dans les pétales de la variété *R. x hybrida* 'Papa Meilland' (Bergougnot et al., 2007) et de *R. x damascena* (d'après Jirovetz et al., 2002).

Composés	<i>R. x damascena</i>	<i>R. x hybrida</i> 'Papa Meilland'
α -pinène	X	
β -caryophyllène	X	X
β -ionone	X	
β -myrcène	X	
Géranyl acétate	X	X
Benzylalcool		X
E-3-hexénol	X	
E-3-hexényl-acétate		X
E-rose oxyde	X	
Citronellal	X	
Citronellol	X	X
DMT		X
Géranial	X	X
Géranol	X	X
Germacrène D		X
Heptadécane		X
Linalol	X	
Méthyleugénol	X	X
Néral		X
Nérol	X	X
Nonadecane		X
TMB		X
Z- β -damascénone	X	
Z-2-hexénal		X
2-phényléthanol	X	X

Les parfums sont très variés chez les roses du groupe des Hybrides de Thé. Des fragrances originales, comme des odeurs fruitées, ont été développées par des obtenteurs : la framboise chez *R. x hybrida* 'Prestige de Lyon', l'anis chez *R. x hybrida* 'Paul Ricard', en sont deux exemples. Les alcools monoterpéniques et le 2-phényléthanol procurent une odeur de rose classique aux variétés occidentales comme *R. x centifolia* et *R. x damascena*. Chez cette

dernière, l'huile extraite des pétales par solvant renferme 62 à 68 % de 2-phényléthanol. Les roses chinoises ont une odeur de thé due à des composés spécifiques notamment le 3,5-diméthoxytoluène (DMT). Par exemple, *R. gigantea* et *R. x hybrida* 'Lady Hillingdon', sont constituées respectivement de 50 % et de 70 % de DMT (Nakamura, 1987 ; Ioichi et al., 2005).

C. Hypothèses sur l'absence de parfum chez les roses coupées

Le port, la forme, la couleur et la tenue en vase sont les caractères recherchés pour développer des variétés de roses coupées (Van de Pol, 1986). Les étapes de cette domestication semblent avoir engendré la perte de parfum, notamment chez les rosiers Hybrides de Thé destinés à la culture en serre et aux fleurs coupées. L'existence d'une liaison génétique entre l'absence de parfum et certains caractères agronomiques comme la résistance aux maladies et la tenue en vase est supposée par certains auteurs (Gudin et al., 1995).

Les causes de l'absence de parfum restent à déterminer. Néanmoins, la compréhension des mécanismes qui ont abouti à la perte du parfum chez certaines variétés a été étudiée par Bergougnoux et al. (2007) par comparaison entre la variété très parfumée *R. x hybrida* 'Papa Meilland' et la variété inodore *R. x hybrida* 'Black Baccara'. Les pétales de la variété non parfumée ne présentent pas de différence majeure, au niveau ultrastructural, avec ceux de la variété parfumée. Ainsi, l'évolution des cellules productrices de composés volatils (épidermes supérieur et inférieur) est identique au cours du développement floral et les mêmes structures et organites sont observés : nappes de réticulum, plastes avec de nombreux plastoglobules, grains d'amidon, épaisseur de la cuticule. Les auteurs démontrent successivement qu'aucune différence d'épaisseur de cuticule ne peut expliquer l'absence d'émission de parfum et qu'aucun déficit de réserve en amidon ne peut expliquer l'absence de production du parfum. Par contre, la suite de l'étude de Bergougnoux et al. (2007) met en évidence de nombreuses vésicules de nature lipidique chez les variétés parfumées et celles non parfumées et seules celles des roses parfumées sont positives au réactif NaDi donné pour être spécifique des terpènes (David et Carde, 1964). Ces vésicules, de nature inconnue, semblent donc être une bonne piste pour mieux comprendre le stockage ou le transport des composés organiques volatils encore nommés COV. Par ailleurs, les voies de biosynthèse étant très peu connues chez les roses, toutes les hypothèses génétiques et biochimiques sur le fonctionnement des

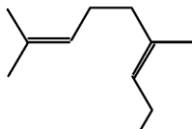
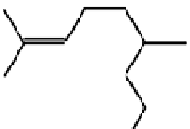
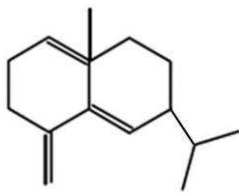
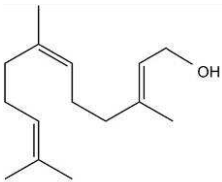
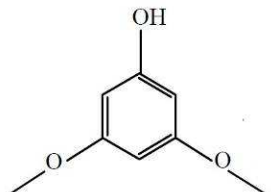
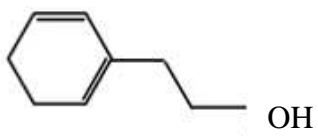
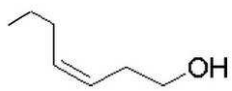
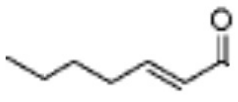
voies de biosynthèse restent valables : dérégulation globale des voies, allèles non fonctionnels...

III. Généralités sur la biosynthèse des COV

A. Les grandes catégories de COV chez les roses

La fragrance des fleurs est un mélange de nombreuses molécules volatiles. Par exemple, plus de 275 COV sont détectés dans l'huile essentielle de *R. x damascena* (Ohloff et Denole, 1987). Ces composés odorants peuvent être regroupés en trois catégories : terpènes, dérivés d'acides gras et dérivés aromatiques (Tableau 5 et Figure 6).

Tableau 5 : composés volatils du parfum de rose appartenant à trois classes de composés.

Les terpènes	
Monoterpènes	
 OH Géraniol	 OH Citronellol
Sesquiterpènes	
 Germacrène D	 Farnésol
Les composés aromatiques	
 DMT	 OH 2-phényléthanol
Les acides gras odorants	
 E-3-hexénol	 Z-2-hexénal

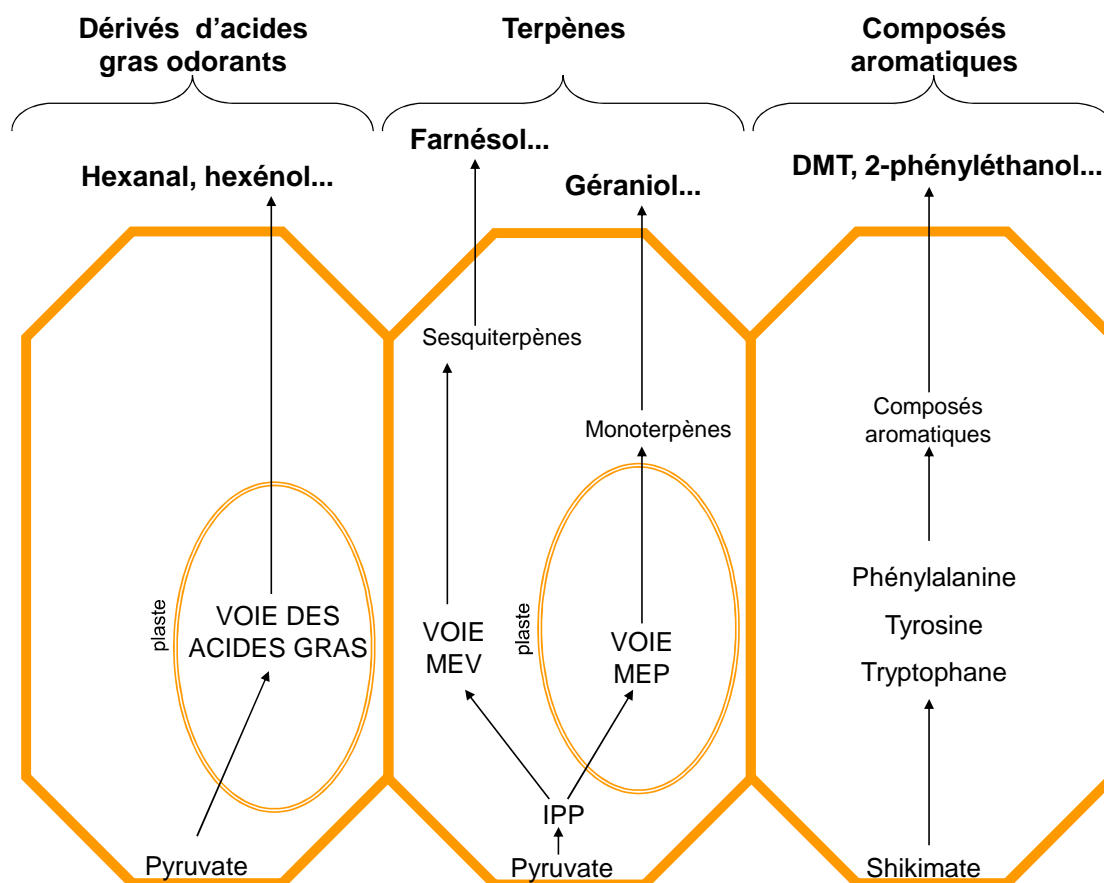


Figure 6 : voie de biosynthèse des trois grandes catégories de COV.

Les terpènes sont des composés dérivant tous d'un même précurseur, l'isopentényl diphosphate (IPP). Ils sont formés par deux voies de biosynthèses : la voie du mévalonate/acétate (MEV), et la voie du 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) se déroulant respectivement dans le cytosol ou les mitochondries et dans les plastes. Parmi ces terpènes, les alcools monoterpéniques comme le nérol, le géraniol et le citronellol et leurs dérivés sont retrouvés en grandes quantités et donnent une odeur de rose typique. D'autres produits participent aussi à cette odeur : des sesquiterpènes linéaires, comme le farnésol, des sesquiterpènes cycliques, comme le germacrène D, et des cétones de rose souvent à l'état de traces mais à fort pouvoir olfactif comme le dihydro- β -ionol et la β -ionone par exemple (Ohloff et Demole, 1987).

Les dérivés d'acides gras odorants sont quant à eux issus de la coupure des acides gras par des lipoxygénases. Ils sont produits et émis par les feuilles et les sépales, souvent suite à une blessure. Ils sont nommés également « green leaf volatiles ». Chez les roses, les principaux dérivés d'acides gras sont l'hexanal, l'hexénol et l'hexényl acétate.

Enfin, les composés aromatiques sont des composés majoritairement présents dans les parfums chez de nombreuses plantes. Parmi tous les composés aromatiques, seule une petite fraction est volatile. Les composés aromatiques dérivent tous d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane. Certains de ces composés aromatiques sont présents en quantités très importantes chez certaines roses, notamment chez *R. wichuraiana* avec le 2-phényléthanol qui donne une odeur typique d'eau de rose dite " odeur rosée " et chez *R. x hybrida* 'H190' avec le DMT (3,5-diméthoxytoluène) qui donne l'odeur de thé. Les composés aromatiques sont divisés en deux catégories (Knudsen et al., 1993) : les phénylpropanoïdes et les benzénoïdes (Figure 7).

Les phénylpropanoïdes, en général, ne sont pas volatils et ils interviennent dans la synthèse des pigments comme les anthocyanes et la lignine. Cependant, certains sont volatils comme l'eugénol et le méthyleugénol.

Les benzénoïdes dérivent des phénylpropanoïdes et sont synthétisés à partir de l'acide trans-cinnamique. Dans les parfums floraux, l'alcool benzylique, le benzoate de benzyle, le benzoate de méthyle et le 2-phényléthanol ainsi que leurs dérivés sont très présents (Knudsen et Tollsten, 1993).

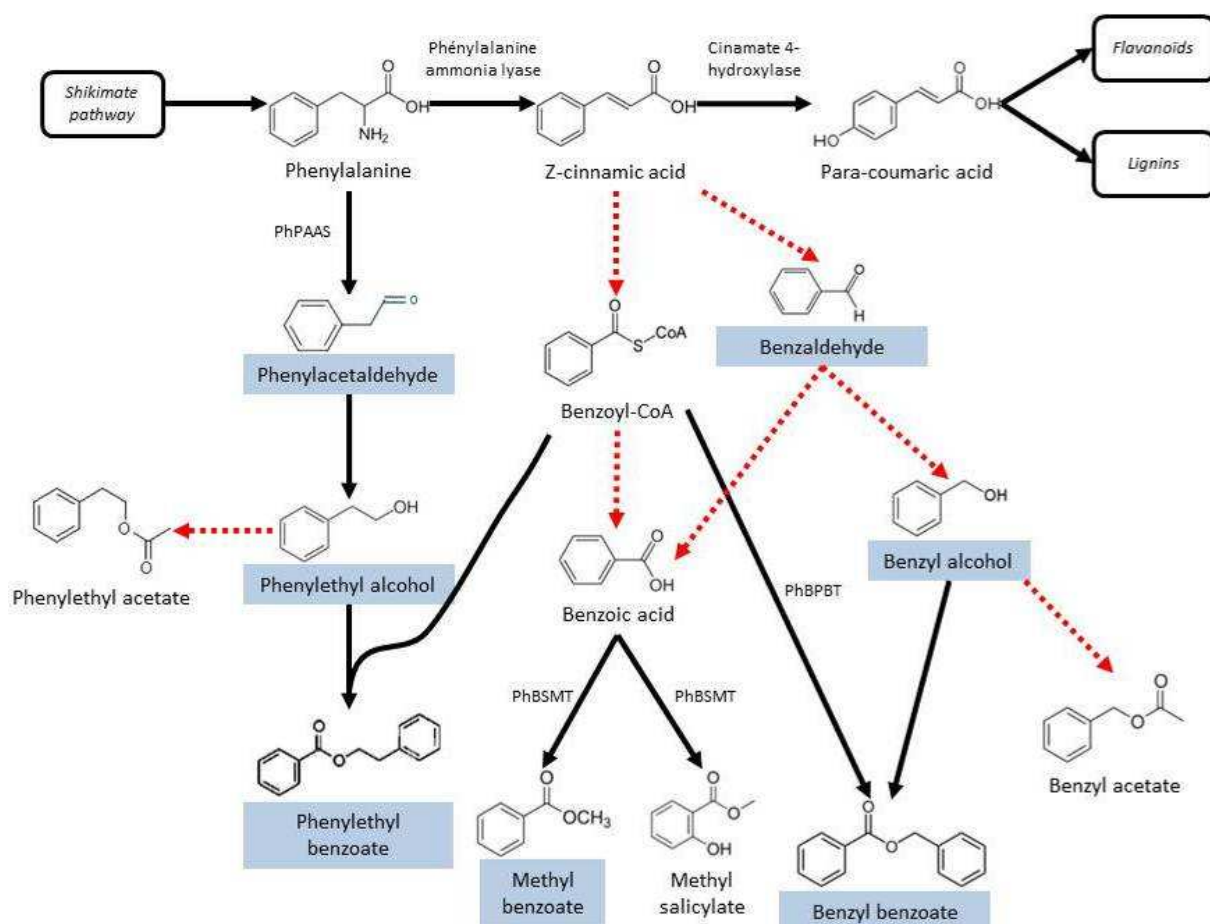


Figure 7 : voies de biosynthèse des composés aromatiques chez le pétunia (d'après Boatright et al., 2004). Les flèches noires indiquent des réactions biochimiques vérifiées et les flèches rouges en pointillées indiquent des étapes biochimiques potentielles comprenant plusieurs réactions. PhBSMT : S-adenosyl-L-méthionine:benzoic acid:salicylic acid carboxyl methyltransferase, PhBPBT : benzoyl-CoA:benzyl alcohol/phenylethanol benzoyl transferase et PhPAAS : phenylacetaldehyde synthase. Les composés volatils benzénoïdes et phénylpropanoïdes encadrés en bleu sont les composés détectés dans le parfum du pétunia.

Les terpènes, les dérivés d'acides gras odorants et les composés aromatiques sont des molécules structuralement différentes et leurs solubilités diffèrent (Tableau 6). Par exemple, les alcools monoterpéniques comme le géraniol, le nérol, le citronellol et leurs dérivés sont très lipophiles. Leur solubilité (logP) est identique ou similaire car ce sont des isomères. Les dérivés d'acides gras odorants ont la caractéristique de posséder une longue chaîne carbonée ce qui leur confère un caractère hydrophobe. Les composés aromatiques tels que le DMT ou le 2-phényléthanol ont la propriété d'être également lipophile mais moins que les autres composés. Il est intéressant de noter que le 2-phényléthanol est le composé le moins

hydrophobe parmi les neuf COV cités. Lors d'une hydrodistillation, on le retrouve en très grande quantité dans la fraction aqueuse (commercialisée sous le nom d'eau de rose).

Tableau 6 : caractère lipophile de quelques COV. LogP aussi appelé Log Kow, est une mesure de la solubilité de composés chimiques dans deux solvants (octanol/eau). LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau : $\text{LogP} = \text{Log}(\text{Coct}/\text{Ceau})$. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. Si LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>).

	Solubilité (logP)
2-phényléthanol	1.70
E-2-hexéнал	1.93
3-5-diméthoxytoluène	2.09
Hexanal	2.28
Géraniol	3.44
Nérol	3.44
Géranial	3.45
Néral	3.45
Citronellol	3.67

B. Diversité des voies de biosynthèse du 2-phényléthanol

Chez la rose, les voies de biosynthèse des terpènes, des dérivés d'acides gras et des dérivés aromatiques sont mal connues et très peu de gènes sont clonés (Channelière et al., 2002 ; Scalliet et al., 2002 ; 2006 ; 2008 ; Shalit et al., 2003 ; Wu et al., 2004). Cependant, en ce qui concerne la biosynthèse du 2-phényléthanol, un gène, nommé *RhPAAS* pour phénylacétaldéhyde synthase, a été cloné (Kaminaga et al. 2006). De plus, des travaux préliminaires ont été menés par l'UMR GenHort pour cartographier le gène *RhPAAS*. Ils ont établie une corrélation sur la population HW entre le phénotype et le génotype concernant la quantité de 2-phényléthanol. Tous les individus ne produisant pas ou peu de 2-phényléthanol ont un génotype b/c et tous les individus en produisant beaucoup ont un génotype a/c. De plus, ce gène, *RhPAAS*, a été colocalisé avec le QTL du 2-phényléthanol sur la carte mâle *R. wichuraiana*. Du fait que la séquence de *RhPAAS* soit connue et que ce gène soit localisé sur la carte génétique de *R. wichuraiana*, notre étude se concentre sur la voie de biosynthèse du 2-phényléthanol.

1. Voie de biosynthèse du 2-phényléthanol chez la rose

Le métabolisme des composés aromatiques comprend des séries complexes de voies biochimiques qui fournissent aux plantes des centaines de composés, souvent spécifiques d'une espèce végétale. Parmi ces composés, le 2-phényléthanol dérivant de la phénylalanine, qui est également le précurseur de la voie classique des polyphénols non volatils comme les acides phénoliques, est synthétisé en deux étapes (Figure 8).

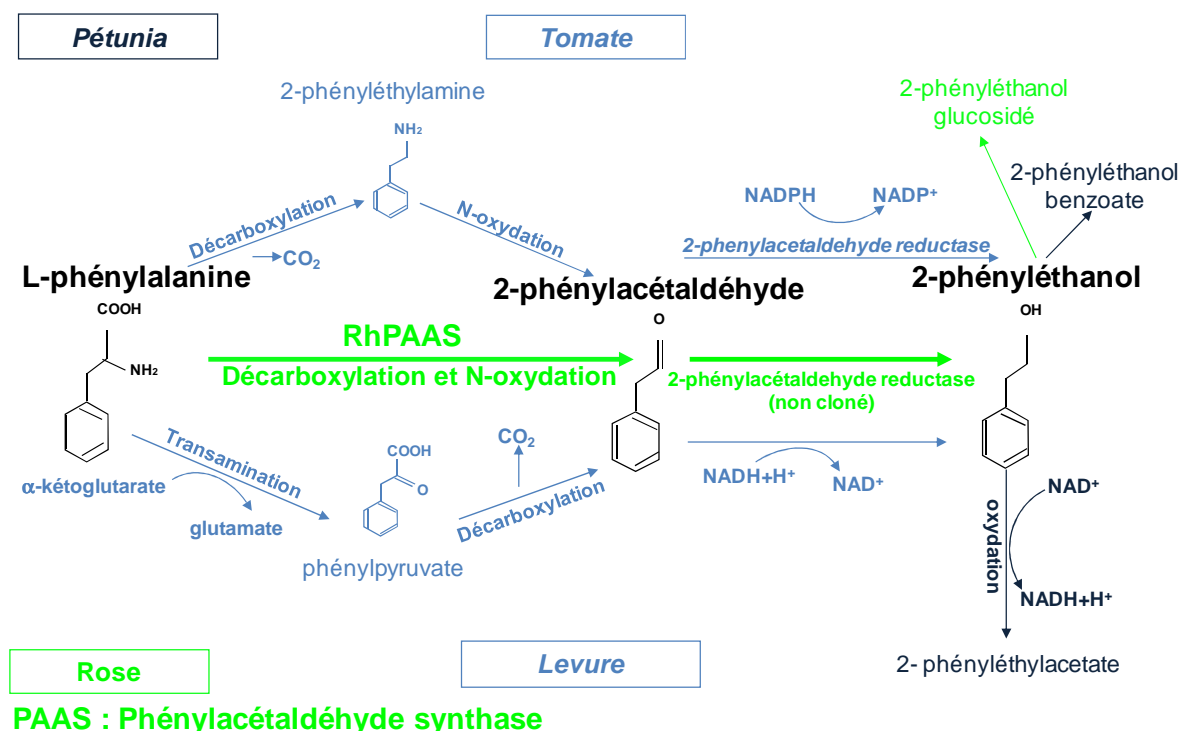


Figure 8 : voie de biosynthèse du 2-phényléthanol et de ses dérivés chez la rose (vert) et chez d'autres organismes tels que le pétunia, la tomate et la levure (bleu clair). Deux autres composés émis, le 2-phényléthanol benzoate et le 2-phényléthylacétate, ont été mis en évidence chez le pétunia (bleu foncé).

La première étape est la synthèse de la 2-phénylacétaldéhyde à partir de la phénylalanine. Cette réaction est catalysée par une enzyme bifonctionnelle, la phénylacétaldéhyde synthase (RhPAAS), qui décarboxyle et désamine la phénylalanine (Kaminaga et al., 2006). La deuxième étape, qui consiste en la formation du 2-phényléthanol à partir de la 2-phénylacétaldéhyde, serait catalysée par une phénylacétaldéhyde réductase, non clonée à ce jour chez la rose. Le gène de la phénylacétaldéhyde synthase de rose (*RhPAAS*) a été cloné par Kaminaga et al. en 2006 (Annexe 5). Il code pour une enzyme homotétramérique qui appartient à la famille du groupe II pyridoxal-5'-phosphate carboxylase acide aminé dépendant. RhPAAS est constituée de cinq cent neuf acides aminés et ne contiendrait pas de

peptide signal en partie N-terminale ce qui suggérerait une localisation cytosolique (Kaminaga et al., 2006). Il est aussi intéressant de noter que *RhPAAS* ne contient pas d'intron.

*Le 2-phényléthanol peut être sous forme glycosylée,
une forme de stockage*

Des mécanismes contrôlant la production de 2-phényléthanol ont été mis en évidence et impliquent notamment sa glycosylation (Hayashi et al., 2004). Chez *R. x damascena* et *R. x sp.* 'Hoh-Jun', le 2-phényléthanol sous forme β -D-glucosidée est produit dans les stades précoces du développement floral, puis sa proportion diminue tandis que la proportion de 2-phényléthanol libre augmente, parallèlement à une augmentation de l'activité β -glucosidase (Oka et al., 1999 ; Sakai et al., 2008 ; Watanabe et al., 2002). De façon similaire, chez *R. x hybrida* 'Lady Seton', le 2-phényléthanol est accumulé sous forme glycosylée dans les pétales (Dunphy, 2006). Dans les fleurs de narcisse, l'augmentation de l'activité β -glucosidase a été corrélée avec l'augmentation de la production du 2-phényléthanol (Reuveni et al., 1999). En effet, l'inhibition de la glucosidase entraîne une diminution de l'émission du 2-phényléthanol (Sakai et al., 2008). L'accumulation de sa forme glucoside permet un stockage sous une forme non volatile et non toxique. Lorsqu'il est hydrolysé, il redevient volatil. Des formes diglycosylées, 6-O- α -L- β -D-glucopyranoside et 6-O- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranose, trouvées dans les bourgeons de *R. x damascena*, auraient un rôle potentiel de précurseurs du 2-phényléthanol (Watanabe et al., 2001).

Profil d'expression de *RhPAAS* chez les rosacées

Dans la littérature, la corrélation de l'expression du gène *RhPAAS* et l'émission du 2-phényléthanol a été étudiée au cours du développement floral. L'accumulation du transcrit *RhPAAS* des pétales de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' est observée au stade bouton très ouvert BTO (Farhi et al., 2010). Dans les pétales de rose, l'accumulation du transcrit *RhPAAS* est régulée de façon diurne (Farhi et al., 2010) et elle est corrélée spatialement et temporellement avec la production du 2-phényléthanol (Kaminaga et al., 2006). Des études récentes montrent que l'extinction de *PhPAAS* par RNAi chez le pétunia amènent à une absence d'émission du 2-phényléthanol (Kaminaga et al., 2006). D'autres gènes reliés au parfum chez d'autres roses tels que celui codant la germacrène D synthase (*RhGDS*), l'alcool acyltransférase (*RhAAT*) et l'orcinol-O-méthyltransférase (*RhOOMT*) montrent le même profil d'expression que *RhPAAS* (Hendel-Rahmanim et al., 2007 ; Lavid et al., 2002, Scalliet et al., 2002, 2006).

Chez la rose, la voie de biosynthèse du 2-phényléthanol n'est pas entièrement connue et un seul gène, *RhPAAS*, impliqué dans la biosynthèse du 2-phénylacétaldéhyde a été cloné. Il resterait alors à connaître la deuxième enzyme impliquée dans la synthèse du 2-phényléthanol. Cette étape a cependant été étudiée sur le fruit de la tomate et sur la fleur entière du pétunia ce qui pourrait servir de point de départ pour une étude chez la rose.

2. Voie de biosynthèse du 2-phényléthanol chez d'autres organismes

a. Voie de biosynthèse du 2-phényléthanol chez les Solanacées

Dans le péricarpe de la tomate, les deux réactions conduisant de la phénylalanine à la phénylacétaldéhyde impliquent au moins deux enzymes différentes (Figure 8). La première enzyme identifiée récemment, l'acide aminé aromatique décarboxylase (AADC), est responsable de la formation de la phényléthylamine (Tieman et al., 2006). La deuxième enzyme, une monoamine oxydase (MAO), responsable de la conversion de la phényléthylamine en phénylacétaldéhyde reste encore à être identifiée. La phénylacétaldéhyde, faiblement accumulée dans les tissus, est rapidement métabolisée en 2-phényléthanol par une action de réductase/déhydrogénase (Tieman et al., 2006). Chez les tomates surexprimant la phénylacétaldéhyde réductase, la quantité de 2-phényléthanol n'augmente pas, indiquant que cette enzyme n'est pas normalement limitante pour la synthèse du 2-phényléthanol. Des tomates transformées avec l'ADNc de AADC sous un promoteur 35S, montre une accumulation de la quantité de la phénylacétaldéhyde et une forte émission du 2-phényléthanol (Tieman et al., 2006).

Chez le pétunia, une petite quantité de COV émis correspond au 2-phényléthyl benzoate. Ce composé est formé à partir du 2-phényléthanol par une enzyme benzoylcoa : benzyl alcool/phényléthanol benzoyltransférase (PhBPBT), catalysant la conversion du 2-phényléthanol en phényléthyl benzoate. Une approche RNAi de *PhBPBT* sur la fleur entière du pétunia, montre *in-vivo* une accumulation de 2-phényléthanol et une absence de phényléthyl benzoate (Dexter et al., 2008).

Les esters acétates volatils comme le phényléthyl acétate sont générés par l'action de l'AAT (Alcool acétyltransférase) (Dudareva et al., 1998). La présence du gène *PhAAT* chez des

pétunias transformés a ainsi permis l'augmentation des composés acétates dans les fleurs détachées de la tige (Guterman et al., 2006).

Les facteurs de transcriptions tels qu'Odorant1 et Pap1 peuvent réguler la production des composés aromatiques chez le pétunia et chez *A. thaliana* (Moyal Ben Zvi et al., 2008 ; Verdonk et al., 2005). En effet, la suppression du facteur MYB Odorant1 du pétunia par RNAi amène à une forte diminution de l'émission des benzénoides dans les fleurs (Verdonk et al., 2005) et la surexpression du gène *AtPAP1* d'*A. thaliana* (proche du gène *PhODO1*) chez le pétunia a permis une augmentation de la production de composés aromatiques dans les fleurs (Verdonk et al., 2005 ; Moyal Ben Zvi et al., 2008).

b. Voie de biosynthèse du 2-phényléthanol chez la levure

Beaucoup de micro-organismes tels que *Saccharomyces cerevisiae* produisent du phénylacétaldéhyde et du 2-phényléthanol. Ces dérivés provenant de la fermentation de la levure sont importants pour la production de nourritures et d'arômes, comme par exemple dans le vin (Clark 1990 ; Leclercq-Perlat et al., 2004). La synthèse du phénylacétaldéhyde se fait à partir de la phénylalanine par transamination puis décarboxylation (Vuralhan et al, 2003 ; Dickinson et al, 2003) (Figure 8). La réduction du phénylacétaldéhyde est faite par une alcool déshydrogénase NADH dépendante et forme le 2-phényléthanol (Vuralhan et al., 2003). Il est donc très surprenant de constater que les voies de biosynthèse et les familles enzymatiques puissent être si différentes d'une espèce à l'autre.

IV. Stockage et sécrétion des COV

Après s'être intéressé aux voies de biosynthèse des parfums, il est nécessaire d'étudier les mécanismes de stockage et de sécrétion des COV afin de mieux comprendre la problématique d'émission du parfum des roses.

A. Hypothèses sur les mécanismes de sécrétion

Chez les végétaux, deux mécanismes fondamentaux sont admis malgré le fait que les mécanismes cellulaires de la sécrétion soient très mal connus (Fahn, 2000). Le premier cas, nommé la sécrétion eccrine, consiste au passage des molécules à travers la membrane plasmique. Dans ce type de sécrétion, deux mécanismes sont observés : la diffusion passive et

le transport actif. Dans le second cas, nommé la sécrétion granulocrine, la fusion des vésicules d'exocytoses avec la membrane plasmique ou l'invagination de la membrane entraîne le détachement des vésicules dans le cytoplasme.

1. Diffusion passive

Des arguments soutiennent la théorie du mécanisme de diffusion passive. Le mécanisme d'émission du parfum des fleurs, étudié dans les pétales de *Petunia axillaris*, est basé sur la concentration endogène et la volatilité du benzaldéhyde, du méthylbenzoate et de l'iso-eugénol. Le taux d'émission de chacun de ces COV oscille de façon synchrone avec la concentration endogène (Figure 9). La volatilité d'un COV est déterminée par son point d'ébullition. En effet, plus celui-ci est faible, plus le COV est émis rapidement. Une corrélation est trouvée entre le point d'ébullition des COV et la quantité émise de COV chez le pétunia. (Oyama-Okubo et al., 2005). Néanmoins cette corrélation n'est pas universelle puisque, par exemple, chez le cédratier, l'abondance des COV émis par les pétales n'est pas en rapport avec la volatilité ; le limonène a un faible point d'ébullition et pourtant il est accumulé dans les tissus alors que le linalool, le plus abondamment émis, a un fort point d'ébullition (Altenburger et Matile, 1990). Ces études sur la diffusion passive mettent en évidence des contradictions permettant d'affirmer la difficulté de lier la volatilité d'un composé avec son émission.

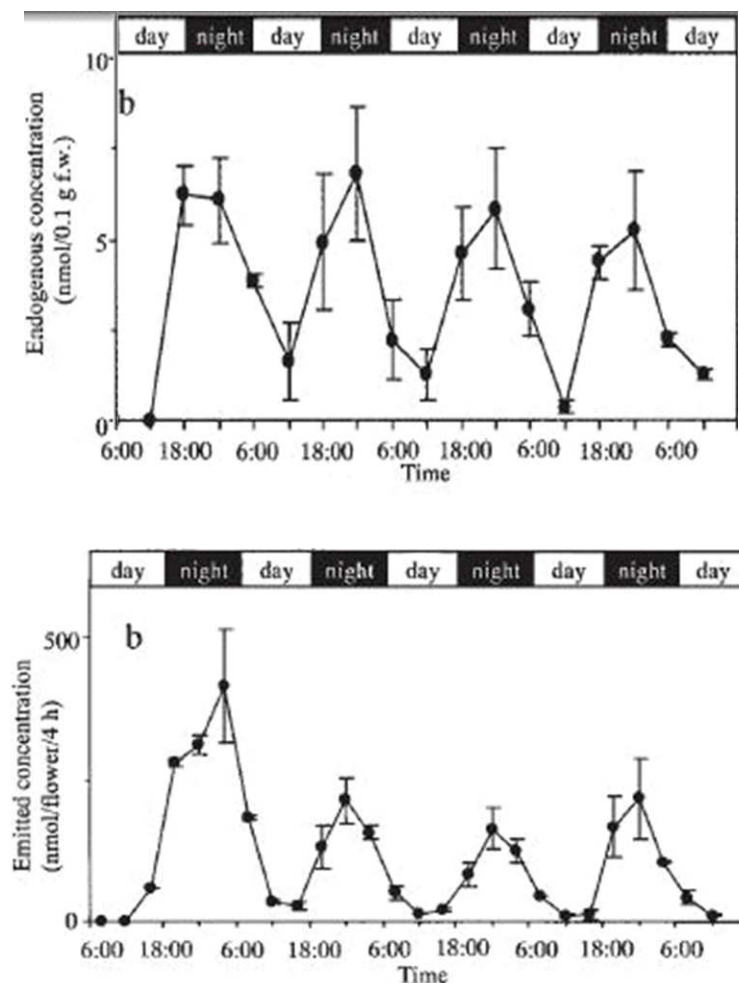


Figure 9 : concentration endogène du méthylbenzoate dans les pétales du pétunia au stade FE et émission du méthylbenzoate (Oyama-Okubo et al., 2005).

2. Le transport actif

Un seul article tend à montrer que les COV pourraient utiliser un transport actif. Le gène *NpABCI* a été cloné chez *Nicotiana plumbaginifolia* et il code pour un transporteur ABC ATP-dépendant (ATP binding cassette transporter) (Jasinski et al., 2001) localisé dans la membrane plasmique. Dans les feuilles, la présence du sclaréol, un diterpène toxique, augmente l'expression du transporteur entraînant la sécrétion du sclaréol à l'extérieur des cellules. Le transport actif pourrait être un modèle plausible chez la rose. Cependant les études ont porté sur le sclaréol, diterpène toxique et non volatil, ce qui n'est pas le cas pour les parfums qui sont des molécules volatiles.

3. La sécrétion granulocrine

Dans les cellules épidermiques du pétale des roses, la sécrétion granulocrine des COV n'a jamais été démontrée. Dans le cytoplasme des cellules, lorsqu'une certaine température est atteinte, des gouttelettes contenant de l'huile essentielle pourraient diffuser à travers la paroi cellulaire et la cuticule (Esau, 1965 ; Fahn, 2000).

Dans les cellules épidermiques du pétale de rose, des corps cytoplasmiques, de nature peut-être lipidique, ont été mis en évidence pouvant être reliés à la sécrétion des monoterpènes (Stubbs et Francis, 1971). De plus, dans les cellules des épidermes de pétales de roses parfumées, de nombreuses vésicules lipidiques de petites tailles sont observées ainsi que des vésicules plus grosses indiquant un contenu terpénique (Figure 10). La présence de ces gouttelettes lipidiques pourrait être liée au stockage et/ou à la sécrétion des composés terpéniques. Ainsi, chez la rose la sécrétion granulocrine est très peu connue et beaucoup d'incertitudes subsistent. Il est intéressant de chercher dans la bibliographie si des vésicules lipidiques ont été mises en évidence dans les pétales d'autres espèces. Dans les pétales d'œillet, *Dianthus caryophyllus*, certains métabolites secondaires lipidiques, incluant des COV, comme les dérivés d'acides gras, pourraient être stockés et libérés par bourgeonnement de vésicules à partir du réticulum endoplasmique ou de la membrane plasmique (Hudak et Thompson, 1996 ; Hudak et Thompson, 1997).

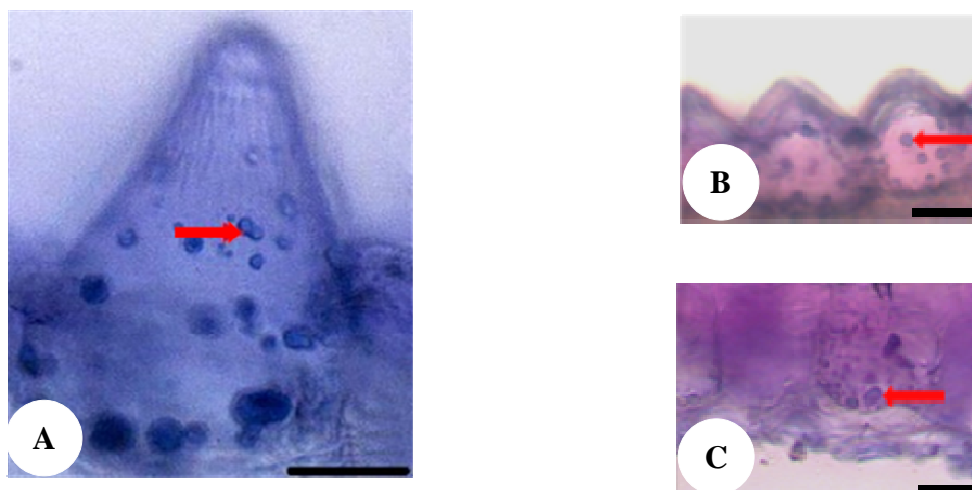


Figure 10 : micrographies optiques après une coloration avec le réactif de NaDi de cellules de l'épiderme supérieur de pétales de la variété *Rosa Generosa* 'Sonia Rykiel' Masdogui en A et *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' en B et C, au stade BTO. Flèches rouges, vésicules lipidiques contenant des terpènes. La barre représente une échelle de 10 μm (Bergougnot et al., 2007).

La sécrétion granulocrine a aussi été étudiée dans d'autres organes de différentes espèces. Ainsi, chez l'arum, *Sauromatum gutatum*, le spadice émet les sesquiterpènes volatils le jour de la thermogénèse. En effet, chez cette espèce, la production de pollen et la réceptivité au pollen sont corrélées à une augmentation de température et à une émission de COV. Quelques jours avant l'émission, des sesquiterpènes sont accumulés dans des poches du réticulum endoplasmique. Le jour de l'émission, ces poches fusionnent avec la membrane plasmique et se vident de leur contenu, qui est alors relâché dans l'atmosphère (Skubatz et al., 1995).

Ces exemples mettent en évidence que différentes catégories de COV ont été repérés dans des vésicules lipidiques. L'observation d'enzyme de voies de biosynthèse des COV a également été montrée dans ce type de compartiment cellulaire. C'est le cas de *Marchantia polymorpha* où des enzymes de voie de biosynthèse des monoterpènes ont été localisées dans des corps lipidiques (Suire et al., 2000). Ces vésicules pourraient donc contenir des COV mais également les enzymes nécessaires à leur synthèse.

Quelle que soit l'espèce étudiée, les COV sont très difficilement localisables dans les vésicules lipidiques des cellules. En effet, il existe très peu de produits spécifiques permettant de mettre en évidence les terpènes (réactif de NaDi). Les colorations classiques telles que Nile Blue A et Nile Red sont par contre utilisables pour visualiser les vésicules lipidiques, donc peut-être indirectement les COV de nature lipidique. Le problème principal en microscopie

est que les vésicules observées sur l'échantillon frais peuvent disparaître lors des procédés de fixation et d'inclusion (Vassilyev, 2000).

Parmi les trois mécanismes de sécrétion, la sécrétion granulocrine s'avère être le plus probable pour le stockage et la sécrétion des parfums malgré les difficultés qui pourront être rencontrées pour visualiser les COV en microscopie. Ainsi, notre étude s'axera plus particulièrement sur la sécrétion granulocrine.

B. Nature des vésicules lipidiques

Tous les types de cellules eucaryotes, comme les animaux et végétaux, contiennent des vésicules lipidiques ainsi que quelques procaryotes. Chez les végétaux, ces vésicules portent des noms différents selon leur localité : des oléosomes dans les graines, des plastoglobules dans les plastes et des tapétosomes dans les anthères. Chez les animaux, elles portent les noms de gouttelettes lipidiques, corps lipidiques, vésicules lipidiques ou globules lipidiques. La structure de tous ces organites est très simple car constituée essentiellement de triglycérides (TG), lipides non chargés, entourés d'un seul feuillet de phospholipides dans lequel s'insèrent des protéines spécifiques (Murphy, 1990).

1. Les vésicules lipidiques animales et fongiques

Chez les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les amphibiens, les cellules stockant les lipides dans des tissus adipeux sont les adipocytes. La forme la plus répandue est le tissu adipeux blanc servant de réserve d'énergie. Il possède des gouttelettes lipidiques de diamètre de 25 à 200 μm . Le tissu adipeux brun, ayant un rôle de thermogénèse, principalement trouvé chez les mammifères hibernants et les fœtus, a des corps lipidiques de diamètre de 2 à 30 μm (Hammerson, 1985 ; Weather et al., 1987). Dans les cellules en différenciation, les adipophilines qui sont des protéines de structure associées aux adipocytes, puis des protéines de la famille des périlipines sont observées dans les étapes plus tardives de maturation des corps lipidiques. Les périlipines favoriseraient la fusion des corps lipidiques entre eux pour la formation des adipocytes ainsi que pour la régulation de l'activité lipasique (Greenberg et al., 1991 et 1993 ; Murphy, 2001).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, des vésicules lipidiques ont aussi été mises en évidence ayant un diamètre moyen de 0,35 μm . Mais il en existe aussi de taille comprise entre 1,2 et 1,6 μm (Zinser et Daum, 1995). Contrairement aux végétaux et aux animaux, les

protéines de structure des vésicules lipidiques n'ont pas été identifiées. Néanmoins, des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides comme le 1-acylglycérol-3-phosphate ainsi que des enzymes de voie de biosynthèse des ergostérols sont détectées dans les corps lipidiques (Zinser et al., 1991).

2. Les vésicules lipidiques végétales

Les oléosomes sont formés par décollement des deux feuilletts de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce décollement est dû à la biosynthèse des triglycérides dont la phase finale est localisée dans le réticulum (Murphy et Vance, 1999). Les oléosomes grossiraient jusqu'à ce qu'ils se détachent et s'individualisent (Wanner et Theimer, 1978) (Figure 11). Ces vésicules lipidiques sphériques sont mises en évidence dans certaines parties des végétaux, notamment les graines. Une étude sur le soja a montré que ces corps lipidiques se trouvent dans les cellules palissadiques du cotylédon et de l'albumen des graines. Dans les graines de cotons, d'oignons et de choux, les corps lipidiques ont un diamètre de 1 μm et, en microscopie, ils semblent entourés d'une membrane à simple feuillet (Yatsu et al., 1971). La nature membranaire de la surface des oléosomes est confirmée en microscopie électronique sur l'arachide, et des protéines associées à la demi membrane sont actuellement étudiées (Yatsu et al., 1972). Les oléosomes de cotylédons de tournesol sont composés de lipides neutres : environ 98 % de triglycérides, 0,8 % diglycérides et 0,1 % d'esters de stérols (Millichip et al., 1996). Les graines de choux, de moutarde, de radis, d'*A. thaliana*, de soja, de tournesol et de maïs contiennent des oléosomes constitués principalement de triglycérides, de protéines, et de phospholipides avec les pourcentages respectifs de 80 %, 15 % et 2 % (Murphy et al., 1989). Trois protéines majoritaires sont mises en évidence dans les oléosomes de graines des végétaux : les oléosines, les caléosines et les stéroléosines (Slack et al., 1980) mais seules les oléosines sont données pour être des protéines de structure spécifiques de cet organite. Elles sont retrouvées aussi dans les oléosomes des grains de pollen. Par contre, les fruits d'avocat et d'olive forment des exceptions puisque les oléosomes du mésocarpe n'ont pas d'oléosine ce qui conduit à un diamètre plus important de l'ordre de 20 μm (Ross et al., 1993).

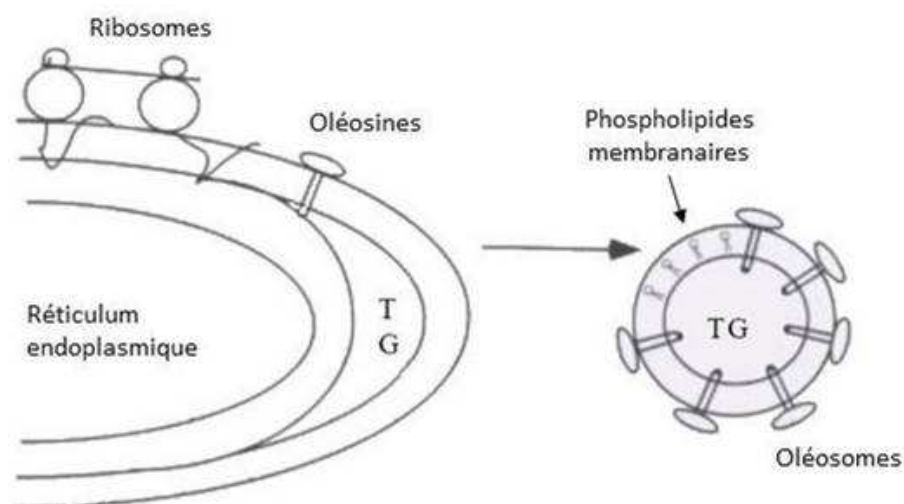


Figure 11 : modèle de formation des oléosomes. TG, triglycérides (d'après Beisson, 1999).

3. Les protéines de structure des oléosomes

Chez *A. thaliana*, seize gènes codant pour des oléosines ont été mis en évidence. Ils sont répertoriés en trois groupes selon la localisation tissulaire : huit gènes dans le tapetum floral, cinq gènes dans les graines et trois gènes retrouvés dans les graines en maturation et dans les microspores qui deviendront le pollen. Chez le maïs et la carotte, les gènes codant les oléosines de la graine, du tapetum ou des microspores ne possèdent aucun intron tandis que dans les graines d'*A. thaliana* (Kim et al., 2002), du soja le gène n'en a qu'un seul (Kalinski et al., 1991). Les oléosomes des graines de végétaux comportent toujours à leur surface au moins deux isoformes d'oléosines : celle de haute masse moléculaire et celle de basse masse moléculaire (Tzen et al., 1990). Cependant, elles n'ont pas le même poids moléculaire selon les espèces allant de 10 à 53 KDa (Kim et al., 2002). En effet, chez le soja, les deux isoformes ont une masse proche de 24 KDa, (Kalinski et al., 1991). Chez le maïs, le riz, le coton et l'orge leurs masses sont de 16 et 18 KDa, tandis que chez le sésame elles sont proches de 15 et 17 KDa ; chez *A. thaliana*, elles sont de 19 et 21 KDa (Chen et al., 1997). L'isoforme de basse masse moléculaire stabilise l'oléosome même si la deuxième isoforme est, elle aussi, présente à sa surface (Figure 12).

Une oléosine est constituée d'une partie N-terminale et d'une partie C-terminale toutes les deux amphiphiles et d'une partie centrale hydrophobe. Les soixante-douze acides aminés hydrophobes contigus représentent quatre fois la taille d'un polypeptide transmembranaire habituel (Huang, 1996). Entre deux oléosines, seules les séquences protéiques du segment central, notamment un motif à trois résidus de proline, sont très similaires. Dans le segment

central hydrophobe de l'oléosine du soja, la présence de résidus leucine espacés régulièrement, ressemblant à un motif « leucine zipper », aurait un rôle dans les interactions protéines-protéines (Keddie et al., 1992). Les oléosines auraient un site d'attachement à la lipase (Vance et Huang, 1987). Du fait de la présence des oléosines, les oléosomes restent individualisés en petites vésicules et ils ne coalescent pas, même au moment de la germination de la graine (Froese et al., 2003). La suppression de l'oléosine chez les plantes transformées d'*A. thaliana* (Rodrigo et al., 2006) et du soja (Schmidt et Herman, 2008) conduit à une accumulation de corps lipidiques géants dans les graines matures.

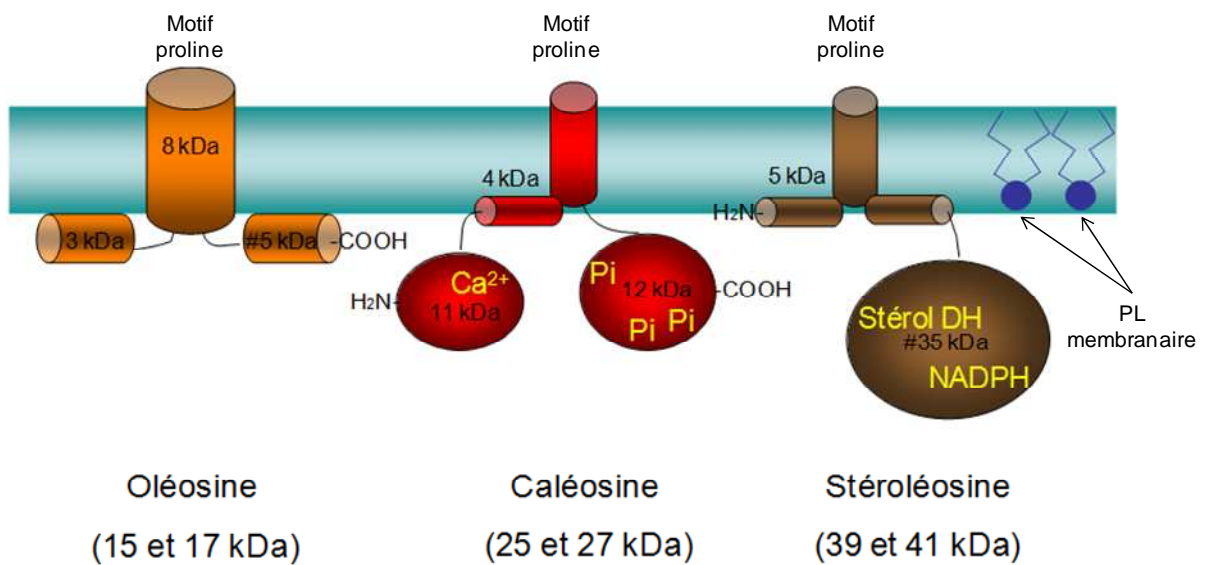


Figure 12 : modèle de la conformation de l'oléosine, la caléosine et la stéroléosine à la surface des oléosomes.

A côté des oléosines, il existe des caléosines associées aux oléosomes des graines en développement notamment découvertes chez le sésame (Chen et al., 1998). Dans le génome d'*A. thaliana*, il y a sept gènes codant des caléosines. Chez le colza, deux isoformes de masses moléculaires différentes, 25 et 27 KDa, sont retrouvées respectivement dans la membrane des corps lipidiques et dans le RE (Hernandez-Pinzon et al., 2001). La caléosine possède en partie N-terminale un site de fixation au calcium et son activité est donc modulée par cette dernière (Frandsen et al., 1996). Elles comportent un segment central hydrophobe de trente résidus d'acides aminés majoritairement hydrophiles, contrairement aux oléosines. Ce segment hydrophobe servant de point d'ancrage aux oléosomes est proche d'une région adjacente riche en proline (Naested et al., 2000) cruciale pour l'adressage des caléosines vers l'oléosome (Chen et Tzen, 2001) (Figure 12). La caléosine est exprimée en réponse à l'acide abscissique ou au stress osmotique dans les graines et les tissus végétatifs. Elles pourraient jouer un rôle dans les fusions de membranes et de corps lipidiques (Murphy et al., 2000 ; Naested et al., 2000) et auraient également un rôle dans la dégradation des lipides de réserves durant la germination de la graine (Poxleitner et al., 2006).

Enfin, les stéroléosines sont présentes dans les corps lipidiques des graines en développement chez différentes espèces. Dans le génome d'*A. thaliana*, huit stéroléosines ont été trouvées. Elles possèdent un domaine de liaison au NADPH et un domaine de liaison aux stérols. Le motif proline des stéroléosines est situé en position N-terminale, contrairement aux oléosines et caléosines où ce motif est retrouvé dans le segment central. Les stéroléosines seraient une classe de déshydrogénases/réductases jouant un rôle dans la transduction du signal par les stérols (Lin et al., 2002) (Figure 12), elles n'ont donc pas forcément un rôle structural.

4. Le cas des tapétosomes et des plastoglobules

Dans l'anthère, le tapetum est la couche de cellules la plus interne du locule. Il contient une grande quantité de reticulum endoplasmique rugueux (RER) et de vésicules lipidiques. Les cellules du tapetum contrôlent la maturation des microspores (Wu et al., 1997). A des stades plus tardifs, les cellules du tapetum sont lysées et les TG ainsi que les stérols sont déposés sur le manteau du pollen en maturation (Robert et al., 1994). Les vésicules observées dans ces tissus, portant le nom de tapétosomes, auraient un rôle structural et fonctionnel analogue aux oléosomes de graines. Ils sont formés par l'accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes membranaires du RER. Lorsque les vésicules atteignent une taille critique, elles se détachent et s'individualisent. Ces vésicules de diamètre compris entre 0,2 et 1 µm, sont

observées à l'intérieur du tapetum d'*A. thaliana* et de *Brassica sp.* (Stanley et Linskens, 1974). Les tapétosomes contiennent comme lipides majeurs des TG et comme protéines de structure, des oléosines, enchâssées dans une simple couche de phospholipides (de Oliveira et al., 1993 ; Ross et Murphy, 1996). Chez *A. thaliana*, il existe neuf gènes codant pour des oléosines du tapetum. Un gène est fortement exprimé et produit une protéine de 53 KDa qui représente 70 % de toutes les oléosines du tapetum (Kim et al., 2002). Chez *Brassica rapa*, ce type d'oléosine a une masse de 45 KDa (Ross et Murphy, 1996).

Les plastoglobules quant à eux sont des vésicules lipidiques localisées dans les plastes. Une des hypothèses de formation des plastoglobules indiquerait qu'elle ressemble à celle des oléosomes (Figure 11). Les plastoglobules seraient formés par l'accumulation de lipides entre les deux feuillettes membranaires des thylacoïdes contenus dans les plastes (Rey et al., 2000) et, lorsque le plastoglobule atteindrait une taille critique, il se détacherait et s'individualiserait. Les plastoglobules servent de réservoirs de TG, de plastoquinone, et d' α -tocophérol. Ils existent dans les plastes de tous types de plantes mais sont surtout présents dans les chloroplastes des jeunes feuilles (Kessler et al., 1999) et durant la sénescence (Tevini et Steinmuller, 1985). Une protéine de structure majoritaire a été mise en évidence dans les plastoglobules des végétaux : la fibrilline (encore nommée PAP, « Plastoglobule Associated Protein »). Le génome d'*A. thaliana* contient treize gènes codant pour des fibrillines toutes localisées dans les plastes (Laizet et al., 2004). Ces protéines ont une ou plusieurs régions hydrophobes qui sont proposées pour stabiliser les plastoglobules et intervenir dans leur coalescence (Deruère et al., 1994) et elle peut aussi être accumulée dans les feuilles sous un stress photo-oxidatif (Chen et al., 1998).

C. Différents rôles des vésicules lipidiques.

1. Rôle dans la biosynthèse et le stockage des parfums

Plusieurs articles avancent l'hypothèse que certaines étapes de biosynthèse des COV pourraient se faire dans les oléosomes et dans les plastoglobules. Cette localisation a été démontrée pour quelques enzymes conduisant à des dérivés d'acides gras volatils ou non. Ainsi des lipoxygénases ont été visualisées à la surface de corps lipidiques de cotylédons de concombre en phase de post-germination (Matsui et al., 1999), elles sont impliquées dans la mobilisation des lipides lors de la germination (Feussner et al., 1995 et 1997). Dans les graines de l'anis, une lipoxygénase a été également localisée dans des oléosomes (Radetzky et

al., 1993). Une autre enzyme, l'hydropéroxyde lyase de *Prunus*, impliquée dans la biosynthèse de dérivés odorants d'acides gras a été détectée, par fusion avec la GFP, dans des corps lipidiques des graines matures. Cette enzyme colocalise avec l'oléosine, marqueur spécifique de ce compartiment, ce qui permet bien de confirmer la présence de cette enzyme dans les oléosomes (Gardner, 1991 ; Mita et al., 2005). Par ailleurs, des enzymes de biosynthèse de terpènes ont aussi été localisées dans des vésicules lipidiques. Ainsi, chez *Crocus sativus*, une caroténoïde dioxygénase, impliquée dans la biosynthèse de la β -ionone, a été localisée dans les plastoglobules pendant le développement du stigmate (Rubio et al., 2008). Chez *Vitis vinifera*, la valence synthase, enzyme produisant des sesquiterpènes volatils notamment le valencène, a été localisée par immunofluorescence dans les oléosomes des microspores (Martin et al., 2009). Il a même été prouvé en immunolocalisation que, chez *Marchantia polymorpha*, des corps lipidiques contiennent toutes les enzymes de la voie de biosynthèse de monoterpènes telles que la géranylgéranyl diphosphatase réductase et la phytoène synthase (Suire et al., 2000).

2. Rôle dans le protéasome et la protéolyse

Deux articles illustrent la présence des sous-unités du protéasome dans les vésicules lipidiques des animaux (Xu et al., 2005 ; Ohsaki et al., 2006). Les apolipoprotéines B sont des protéines constitutives des lipoprotéines à faible densité. Pour la formation des lipoprotéines à faible densité, des groupements lipidiques comme les TG et les esters du cholestérol doivent être rajoutés aux apolipoprotéines B. Leurs assemblages se déroulent dans la lumière du RE. Après lipidation et maturation de ces apolipoprotéines B, elles sont transportées au Golgi (Olofsson et al., 1999 ; Pan et al., 2002). Quand l'assemblage ne se fait pas efficacement ou dans le cas où les lipides sont insuffisants, l'excès d'apolipoprotéine B est destiné à être dégradé via le protéasome après être ubiquitinilé (Fisher et al., 1997 ; Cavallo et al., 1999). Dans les travaux d'Ohsaki en 2006, le rôle fonctionnel des vésicules lipidiques dans l'assemblage des lipoprotéines à faible densité a été étudié chez les animaux, notamment dans les hépatocytes. Il a été montré que les apolipoprotéines B ubiquitinilés adhèrent aux vésicules lipidiques. En microscopie électronique, ces corps lipidiques stockant à leur surface ces protéines avoisinent le protéasome afin que celles-ci soient dégradées (Ohsaki et al., 2006). Pour mettre en évidence les interactions entre les vésicules lipidiques entourées d'apolipoprotéines B et le protéasome, un inhibiteur du protéasome a été utilisé ; ceci engendrant une forte accumulation des apolipoprotéine B autour des vésicules lipidiques.

Pour confirmer l'association des composants du protéasome et des protéines ubiquitinilées avec les vésicules lipidiques, un « Western blot » a été réalisé sur la fraction vésiculaire ; les apolipoprotéine B, leur forme ubiquitinilée et la sous-unité 26S du protéasome ont été détectées. Ces vésicules lipidiques seraient donc un lieu de transport des protéines ubiquitinilées et interagiraient ainsi avec le protéasome. Un autre rôle hypothétique pourrait être mis en évidence. Même si le protéasome est hautement efficace dans la dégradation des protéines ubiquitinilées, il y a toujours un risque que les protéines qui doivent être dégradées, peuvent se retrouver sous forme d'aggrégats car les quantités de ces molécules de grande taille excèdent la capacité du protéasome (Kopito, 2000). Ainsi, des aggrégats se forment et conduisent à des dommages cellulaires. Pour empêcher la formation d'aggrégats toxiques dans le cytoplasme, l'accumulation d'apolipoprotéine B se localiserait dans les vésicules.

3. Rôle dans le stress

Dans les cellules épithéliales des glandes mammaires, des vésicules lipidiques ont été isolées par une technique de flottaison. Par immunofluorescence, une protéine chaperonne, la BiP2 (« binding immunoglobulin protein »), a été localisée dans l'hemi-membrane des vésicules lipidiques (Prattes et al., 2000). La BiP2 a également été révélée dans les vésicules lipidiques des adipocytes des animaux (Brasaemle et al., 2004). Les BiP sont des chaperones de type HSP70. Elles ont une fonction dans le repliement des protéines dénaturées (Haas, 1994). Dans les cellules des mammifères, il a été mis en évidence que différentes chaperonnes telles que HSC 70, HSP 70 et HSP 90 sont localisées dans des vésicules lipidiques. Dans les adipocytes du rat, la chaperone HSP70 est retrouvée en grande quantité après un choc thermique. Une explication est proposée selon laquelle l'HSP 70 replierait les protéines dénaturées qui seraient accumulées à la surface des vésicules et seraient ainsi stockées sous forme repliées (Jiang et al., 2007). Une analyse protéomique des vésicules lipidiques purifiées à partir de monocytes humains a permis d'identifier une HSP 70 et la BiP2 (Wan et al., 2007). Ainsi, les vésicules lipidiques seraient un lieu de stockage des chaperones et les protéines dénaturées seraient accumulées dans ce compartiment.

4. Rôle dans la biosynthèse des lipides

D'autres protéines liées à la synthèse des lipides sont localisées dans des corps lipidiques. La « NAD(P)H steroid dehydrogenase-like » (NSDHL) codant une 3- β -hydroxystéroïldéshydrogénase est impliquée dans la voie de biosynthèse du cholestérol. Par

fusion avec la GFP, la NSDHL de souris a été localisée dans les membranes du RE et accumulée à la surface des corps lipidiques (Caldas et Herman, 2003). Il est intéressant de noter que cette protéine est de la même famille que les stéroléosines.

Une lipase, associée à la membrane, et une diacylglycérol-acyltransférase ont été détectées dans les corps lipidiques de maïs (Lin et Huang, 1984 ; Matsui et al., 1999). Dans les adipocytes des animaux, la diacylglycérol-acyltransférase, qui catalyse la conversion des diglycérides en triglycérides, a été localisée en microscopie dans des vésicules lipidiques. Dans les cellules des mammifères, une lipase hydrolysant les TG a été mise en évidence dans des gouttelettes lipidiques. Elle aurait également un rôle dans la dégradation de ces vésicules (Smirnova et al., 2006). Ainsi une partie de la biosynthèse des TG se déroule dans ce compartiment (Kuverschner et al., 2008).

Des enzymes de voies de biosynthèse des lipides, notamment des stérols, sont également observées dans les vésicules lipidiques des levures. La squalène époxidase en est un exemple : après fractionnement cellulaire, elle est retrouvée dans le RE à 62 % et dans les vésicules lipidiques à 38 %. Cependant, du fait que son activité soit seulement détectable dans le RE, la séquestration dans les vésicules pourrait l'inactiver à cause d'une séparation physique avec ses partenaires. La stérol $\Delta 24$ -méthyltransférase, enzyme catalysant la dernière étape de la voie de biosynthèse des stérols, est trouvée principalement dans la fraction vésiculaire (Leber et al., 1998). En microscopie, l'oxidosqualène cyclase est associée aux vésicules lipidiques et son activité dans ce compartiment a été notée (Milla et al., 2002). Des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des acides gras tels que des acides gras coA ligase sont également mis en évidence dans les vésicules lipidiques (Athenstaedt et al., 1999). Les vésicules lipidiques sont donc un site de stockage des enzymes de voies de biosynthèse des lipides, et participent également au métabolisme des stérols.

5. Rôle dans les interactions avec le cytosquelette

En immunoblot, la β -actine, protéine du cytosquelette, a été localisée dans les vésicules lipidiques des adipocytes chez le rat (Fong et al., 2001). La présence de cette protéine à la périphérie des gouttelettes lipidiques de cellules de la médullosurrénale a également été montrée. Le rôle de ces protéines dans le transport intracellulaire des globules lipidiques est mal connu aujourd'hui (Fong et al., 2001). Néanmoins, de manière générale, les interactions entre l'actine et les lipides membranaires jouent un rôle important dans le maintien de la forme des cellules, leur mobilité et l'adhésion des cellules. Une étude protéomique des

adipocytes des animaux a permis de révéler la tubuline dans les vésicules lipidiques. Lors de la lipolyse, l'association de la tubuline et des vésicules lipidiques pourraient être importante pour faciliter la fragmentation des vésicules (Brasaemle et al., 2004). Des travaux effectués sur la cellule mammaire en lactation suggèrent un transport des vésicules lipidiques guidé au moyen de la dynéine, protéine du cytosquelette, le long des microtubules (Wu et al., 2000). Dès la synthèse des gouttelettes lipidiques au niveau du RE, les vésicules lipidiques seraient transportées sur les microtubules en direction du pôle apical de la cellule grâce à la dynéine (Lacey et al., 1994), sous l'éventuelle contrôle de la vimentine et de TIP47, protéine de la famille des périlipines. Dans les cellules mammaires, les vésicules lipidiques possèdent de la dynéine (Wu et al., 2000) et également présentent à leur surface de la vimentine, connue pour interagir avec la dynéine cytoplasmique (Franke et al., 1987 ; Mc Gookey et Anderson, 1983). Ces données laissent supposer que les adipophilines et/ou les TIP47, protéines de structure des vésicules lipidiques, pourraient contrôler leur transport à l'aide des dynéines sur le réseau cytosquelettique. Ainsi, les vésicules lipidiques seraient impliquées dans les structures dynamiques de transport.

V. Objectifs de la thèse

La rose est la fleur coupée la plus vendue au monde. Elle a aussi une place prépondérante en horticulture et dans l'industrie des parfums, et, à ce titre, elle peut tout à fait prétendre à être un modèle de variété horticole. Actuellement, les obtenteurs cherchent à rendre les fleurs coupées plus odorantes et à obtenir des parfums puissants ou originaux pour les rosiers de jardin. Malheureusement, ce caractère n'est pas le plus facile à maîtriser dans les croisements et il est fréquent de n'obtenir que quelques descendants parfumés lorsque l'on croise deux parents parfumés. Le laboratoire BVpam s'intéresse à ce problème et cherche à comprendre les mécanismes qui empêchent ou qui limitent la biosynthèse et la sécrétion des COV dans les pétales de rose. Mes objectifs de thèse se sont inscrits dans les deux axes de ce travail : i/ caractériser le compartiment cellulaire qui semble être impliqué dans le stockage et/ou la biosynthèse des COV parce que des travaux préliminaires convergeaient vers l'hypothèse du rôle des oléosomes et ii/ comprendre un mécanisme de biosynthèse en étudiant celui du 2-phényléthanol parce qu'il présente une ségrégation claire dans la population HW.

Ainsi, par comparaison avec d'autres espèces à fleurs odorantes, beaucoup d'hypothèses, allant de la diffusion passive à un transport actif, ont été déclinées. Cependant, grâce à des travaux antérieurs (Bergougnoux et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse que les molécules

volatiles sont à un moment donné véhiculées par des oléosomes. Deux questions se sont posées lors de ma thèse. Quelle est la nature des vésicules observées dans les pétales de roses? Ont-elles un rôle dans la biosynthèse, le stockage ou la sécrétion des COV ? Nous nous sommes tout d'abord attachés à démontrer la présence d'oléosomes dans les pétales en travaillant sur trois de leurs caractéristiques : i/ une matrice centrale où se concentrent les TG et autres lipides neutres cellulaires, ii/ une membrane à un seul feuillet phospholipidique et iii/ des protéines de structures nommées oléosines. Nous avons ensuite cherché à montrer si ces vésicules sont impliquées dans le stockage des enzymes de voie de biosynthèse des COV et/ou dans le stockage des COV eux mêmes.

Par ailleurs, il a été montré que le QTL majeur expliquant la présence de 2-phényléthanol chez *R. wichuraiana* et le gène *RhPAAS*, impliqué dans la biosynthèse du 2-phényléthanol, sont localisés sur le même locus dans le groupe de liaison B6 (L. Hibrand-Saint Oyant, F. Foucher, S. Baudino, J.-C. Caissard, Comm. Pers.). Dans notre cas, la modulation de l'expression du gène *RhPAAS* est donc une excellente hypothèse pour expliquer la présence ou l'absence de 2-phényléthanol dans la population HW de Hibrand-Saint Oyant et al. (2008), sachant qu'ils ont mis en évidence que 50 % de cette population produisaient beaucoup de 2-phényléthanol et que les 50 restants en produisaient peu. Pour cela, il a été important, dans un premier temps, de définir la cinétique de production du 2-phényléthanol au cours du développement floral chez *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' et de choisir le stade et l'organe pour lesquels la quantité de 2-phényléthanol est maximale. Dans un deuxième temps, une cinétique de l'expression du gène *RhPAAS* au cours du développement floral a été réalisée ainsi qu'une étude des différents allèles du gène *RhPAAS* dans la population HW. Ce travail permettrait donc de répondre aux deux questions suivantes : Est-ce qu'il y a une corrélation entre l'expression du gène *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol chez la population HW ? Existe-t-il des différences alléliques de *RhPAAS* qui expliqueraient cette corrélation ?

Enfin, comme nous le verrons, des liens entre ces deux axes ont pu être discutés grâce à mon travail et nous nous sommes finalement posés la question d'un stockage du 2-phényléthanol sous forme glycosylée avant l'épanouissement de la fleur. Il semble donc que nous ayons mis en évidence un stockage de certains composés, stockage qui pourrait se faire dans les

oléosomes. L'émission de parfum par les fleurs serait alors rythmée non seulement par les voies de biosynthèse mais aussi par des mécanismes de stockage et de relargage régulés au niveau cellulaire. Ces hypothèses pourraient ouvrir de nouvelles perspectives de recherche.

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal, souches et plasmides

A. Matériel végétal

1. Espèces et variétés de roses

Plusieurs espèces de roses ont été utilisées dans ce travail : *R. x hybrida*, *R. canina* (églantier) et *R. wichuraiana* (rosier de Wichura). Parmi les roses hybrides, plusieurs variétés ont été utilisées : ‘The Mac Cartney Rose’, ‘Caprice de Meilland’, ‘Line Renaud’ et ‘Gregory Lemarchal’ (Figure 13).



Figure 13 : variétés de roses hybrides parfumées utilisées pour l'étude des COV dans la fraction vésiculaire. A) 'The Mac Cartney Rose'. B) 'Caprice de Meilland'. C) 'Line Renaud'. D) Gregory Lemarchal'.

R. x hybrida 'The Mac Cartney Rose' est cultivée en extérieur à côté du laboratoire, à la roseraie de Saint-Galmier (Loire) et en champs par les établissements Meilland-Richardier (Diemoz, Isère). *R. x hybrida* 'Caprice de Meilland', *Rosa x hybrida* 'Line Renaud' et *Rosa x*

hybrida 'Grégory Lemarchal' sont cultivées en champs par les mêmes établissements. Un rosier sauvage, l'églantier, a été étudié pour ses graines qui ont été récoltées dans la nature autour de Saint-Etienne. Certaines roses, notamment celles cultivées pour les fleurs coupées, sont quasiment dépourvues de parfum. Dans notre étude, quatre variétés de roses hybrides non parfumées ont été achetées chez un grossiste (Etablissements Bravard, Saint-Etienne, Loire) : 'Duett', 'Akito', 'Rose de la Belle' et 'Sonrisa' (Figure 14). Toutes les variétés citées ont été utilisées dans tous nos travaux de fractionnement cellulaire.



Figure 14 : variétés de roses non parfumées pour l'étude des COV dans la fraction. A) 'Duett'. B) 'Akito'. C) 'Rose de la Belle'. D) 'Sonrisa'.

Rosa x hybrida 'Akito' a aussi été utilisée pour les expériences de localisation cellulaire par expression transitoire d'une oléosine-GFP après infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les pétales.

R. wichuraiana et *R. x hybrida* 'H190' ont fait l'objet d'une carte génétique réalisée à l'aide de marqueurs AFLP (Crespel et al., 2002). Dans ces travaux, une population interspécifique F1 composée de 733 hybrides a été obtenue par le croisement de ces deux rosiers choisis pour leurs caractères très différents (Tableau 7). L'ensemble est cultivé à l'INRA d'Angers. *R.*

wichuraiana est un rosier botanique diploïde utilisé comme parent mâle et *R. x hybrida* ‘H190’, utilisé comme parent femelle, est un dihaploïde issu de la régénération de gamètes femelles de *Rosa x hybrida* ‘Zambra’ fécondées avec du pollen irradié (Meynet et al., 1994). Seuls 91 hybrides ont été utilisés pour établir la carte génétique des parents et ainsi de détecter un QTL majeur du 2-phényléthanol.

Tableau 7 : caractères phénotypiques divergents entre les deux parents de la population HW.

<i>R. x hybrida</i> ‘H190’	<i>R. wichuraiana</i>
parent femelle	parent mâle
dihaploïde	diploïde
double fleur jaune	simple fleur blanche
sans épine	avec épine
sensible aux maladies	résistant aux maladies
port buissonnant	couvre-sol
remontant	non remontant
pas ou très peu de 2-phényléthanol	2-phényléthanol

2. Stades de développement

Plusieurs expériences ont été réalisées à des stades précis de développement des fleurs. Les six stades présentent des caractéristiques spécifiques énumérées ci-dessous (Figure 15) :

le stade ‘bouton fermé’ (BF), où les sépales, bien redressés, recouvrent totalement les pétales

le stade ‘Bouton juste ouvert’ (BJO) où les sépales, bien que toujours redressés, laissent entrevoir les premiers pétales

le stade ‘bouton ouvert’ (BO) où les sépales commencent à s’écarter et où les pétales externes débutent leur dépliement

le stade ‘bouton très ouvert’ (BTO) où les sépales se renversent et où un grand nombre de pétales sont dépliés

le stade ‘fleur épanouie’ (FE) où l’ensemble des pétales sont dépliés

le stade ‘fleur sénescence’ (FS) où quelques pétales se détachent du réceptacle floral et où les étamines, les styles et les stigmates deviennent visibles.

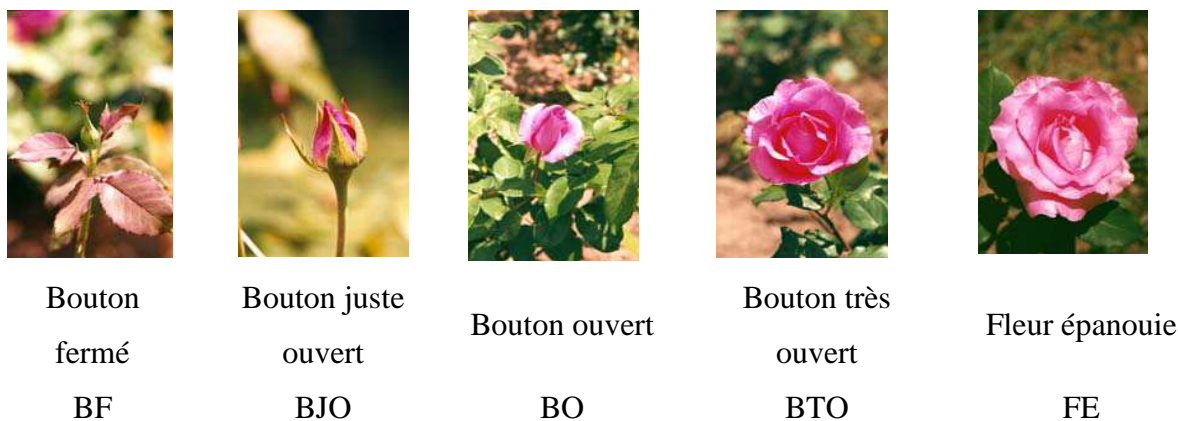


Figure 15 : différents stades de développement de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' (d'après Bergounoux et al., 2007).

B. Souches bactériennes

La souche Oléo1-GFP d'*Agrobacterium tumefaciens* a été fournie par le laboratoire RDP (N. Thazar, ENS Lyon) et a été utilisée pour l'étude de la localisation cellulaire d'une oléosine par expression transitoire dans les pétales de roses.

La souche 35S-GFP d'*A. tumefaciens* a été utilisée pour l'étude de la localisation cellulaire du cytoplasme par expression transitoire dans les pétales de roses.

La souche C58C1 d'*A. tumefaciens* a été utilisée pour améliorer l'expression transitoire. Cette souche possède un plasmide 35S-P19 qui est un suppresseur du silencing.

La souche JM109 d'*Escherichia coli* sert au clonage, à la multiplication et à la conservation des gènes.

C. Plasmides

1. Plasmides pour l'expression dans les cellules végétales

Pour l'étude de l'expression transitoire dans les cellules végétales de roses, trois vecteurs sont utilisés.

Le vecteur « Gateway » permet l'expression d'un gène codant pour l'oléosine sous le contrôle d'un promoteur fort 35S. La protéine produite (oléosine) est fusionnée avec la « Green Fluorescent Protein » (GFP) en position C-terminale. La GFP fluoresce en vert lorsqu'elle est excitée par une longueur d'onde de 488 nm. Ce vecteur permet l'étude de la localisation cellulaire du produit d'un gène en faisant de l'expression transitoire sur des cellules végétales

de rose par infiltration d'*A. tumefaciens*. Les souches ont été cultivées avec de la kanamycine 50mg/L, de la gentamicine à 20 mg/L et de la rifampicine à 50 mg/L (Figure 16).

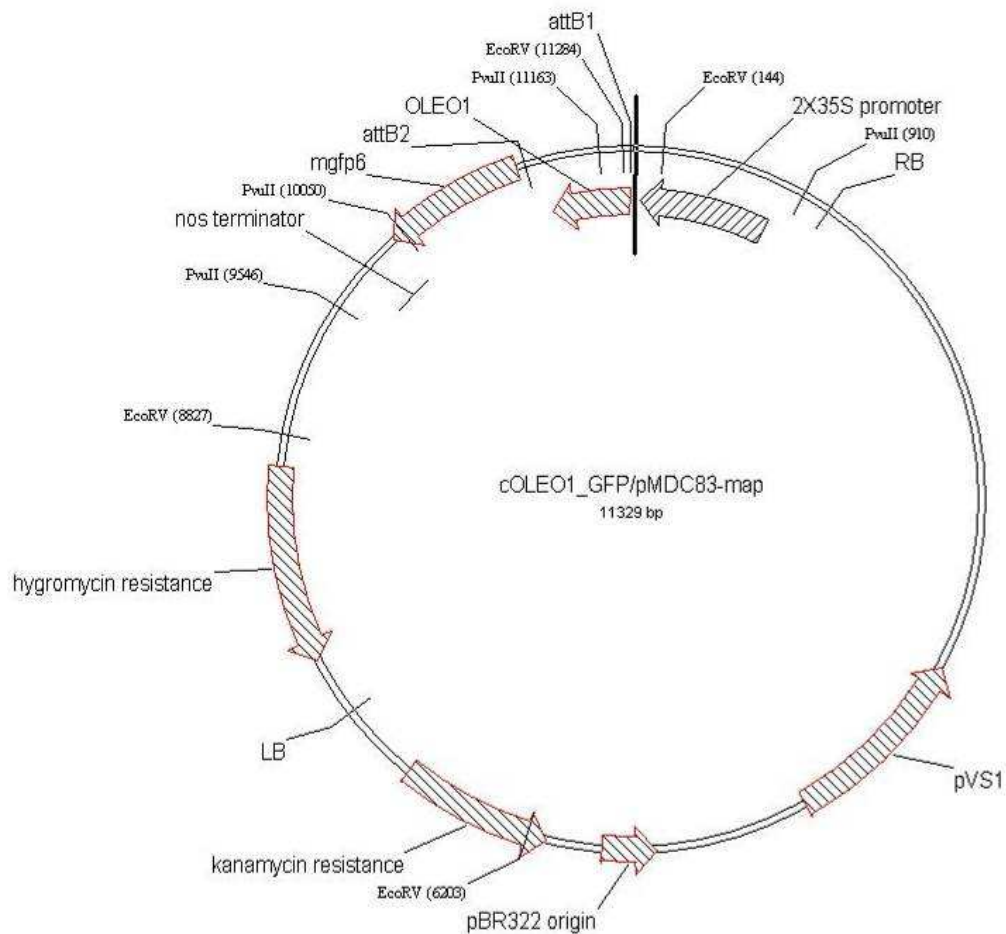


Figure 16 : carte du vecteur « Gateway » permettant l'expression d'un gène codant pour l'oléosine sous le contrôle d'un promoteur fort 35S (Nelcy Thazar, ENS)

Le vecteur pBin61 permet l'expression du gène codant la protéine P19, sous le contrôle d'un promoteur fort 35S. La protéine produite a une taille de 19 KDa. P19 est une protéine codée par le virus « Tomato Bushy Stunt Virus » (TBSV). Elle a pour rôle d'améliorer l'expression transitoire en supprimant le silencing. Le vecteur possède des gènes de résistance à la kanamycine à 50mg/L et à la gentamicine à 20 mg/L.

Le vecteur pBI121 est un vecteur binaire, couramment utilisé dans les expériences de transformation génétique. Il permet l'expression du gène GFP, sous le contrôle d'un promoteur fort 35S. Le vecteur possède des gènes de résistance à la kanamycine à 50mg/L, à la gentamicine à 20 mg/L et à la rifampicine à 50 mg/L.

2. Plasmides de séquençage, multiplication et conservation des gènes

Le plasmide pGEM®-Teasy (Promega) est utilisé pour le séquençage, la multiplication et la conservation des gènes et fragments de gènes isolés tout au long de l'étude. Le clonage des gènes se fait au milieu d'un site multiple de clonage situé à l'intérieur d'un gène *lacZ*, codant pour la β -galactosidase : ceci permet une coloration blanc-bleu des clones ayant l'insert.

II. Techniques d'analyse des COV

Une des techniques permettant l'analyse des lipides volatils et des COV de roses est la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La CPG couplée au spectre de masse (SM) permet d'identifier les COV, ou couplée au détecteur à ionisation de flamme (DIF) permet de quantifier les COV.

A. Préparation des échantillons

1. Par extraction au solvant

L'extraction consiste à piéger les molécules odorantes par un solvant organique. Elle a été réalisée dans des tubes en verre à bouchon à vis étanche. Un extrait a été obtenu en mettant en contact 0,5 g de pétales frais et 2 mL d'une solution hexane/camphre à 10 mg/L pendant une nuit à -20°C. Le camphre sert de standard interne, permettant de corriger l'évaporation du solvant qui se produit durant les analyses. L'extrait est récupéré et transféré dans des vials, puis analysé par CPG.

2. Par headspace dynamique

La technique de « headspace » ou technique de capture d'effluves est employée pour étudier les COV émis par une fleur en les piégeant, pendant un temps défini, sur un polymère solide comme par exemple le Tenax.

Les roses produisent et émettent des COV suivant un cycle diurne circadien dans lequel le maximum d'émission se situe au milieu de la phase de jour (Helsper et al., 1998). Afin de limiter les fluctuations dues à ce rythme d'émission, les analyses des plantes cultivées en extérieur ont été faites entre 10 h et 13 h.

Les fleurs sont enfermées dans un sac de polyéthylène téréphtalate (Nalophan) équipé d'une entrée et d'une sortie. A l'entrée, l'air est filtré sur du charbon actif (Orbo32, Supelco). L'air purifié est aspiré avec un débit de 140 mL/min et poussé avec un débit de 120 mL/min : le sac est parcouru par un flux d'air de 311 mL/min. A la sortie, les COV sont collectés pendant 3 h dans une cartouche de verre (75 mm x 4 mm) contenant 30 mg de Tenax. Les COV sont ensuite élués deux fois avec 1 mL d'hexane, puis 6 µL d'une solution hexane/camphre à 10 mg/L sont ajoutés. L'extrait est analysé en CPG-SM et CPG-DIF.

B. Analyse des COV par CPG

1. Identification des COV en CPG-SM

Les COV ont été séparés par CPG (Agilent 6850) et analysés par SM à bombardement électronique (Agilent 5973). Cet appareil est équipé d'une colonne capillaire HP-Innowax de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 µm d'épaisseur de film, avec une phase stationnaire polaire : le polyéthylène glycol. Le gaz vecteur est l'hélium. Le volume d'injection est de 2 µL. Le voltage d'ionisation est de 70 électrons Volts (eV). Les différentes conditions d'analyse en CPG-SM sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : conditions opératoires choisies pour les différentes analyses en CPG-SM : A) pour l'étude des COV extraits des vésicules obtenues par gradient de saccharose. B) pour l'étude des COV extraits des pétales de la population HW. C) pour l'étude de la composition en acides gras des TG extraits des vésicules.

Paramètres	A	B	C
Température initiale (°C)	40	40	150
Température injecteur (°C)	250	250	220
Mode d'injection	split (ratio 2:1)	splitless	splitless
Pression (psi)	6,98	6,95	17,25
Débit (mL/min)	1	1	1,3
Mode	débit constant	débit constant	débit constant
Température détecteur (°C)	280	280	280
Start m/z	50	50	50
End m/z	550	550	550
Temps d'analyse (min)	111	111	34
Programmation de la température du four			
Température initiale (°C)	40	40	150
Durée 1er palier (min)	3	3	1
Rampe (°C/min)	1,5	1,5	15
Température 2ème palier (min)	180	180	200
Durée 2ème palier (min)	0	0	0
Rampe (°C/min)	6	6	2
Température 3ème palier (min)	240	240	250
Durée 3ème palier (min)	5	5	5

En CPG-SM, l'identification des molécules d'un mélange inconnu est réalisée grâce à deux paramètres. Premièrement, les molécules sont identifiées par comparaison entre leur temps de rétention et ceux des molécules étalons. Deuxièmement, la comparaison des spectres de masse permet de confirmer l'identification. En absence d'étalons, les spectres de masse des molécules à identifier sont comparés à ceux obtenus dans une base de données Wiley 275.

2. Analyse des COV en CPG-DIF

L'appareil de CPG-DIF (Agilent 6850), est équipé d'une colonne identique à celle de la CPG-SM. Les conditions d'analyse sont les suivantes : la température de l'injecteur est de 240°C et celle du détecteur est de 250°C. Le gaz vecteur est l'hydrogène avec un débit de 1,2 mL/min. La programmation de la température du four est la suivante : elle est maintenue pendant 3 min à 40°C après l'injection, suivie d'une augmentation de 1,5°C/min jusqu'à 180°C, elle-même suivie d'une hausse de 6°C/min jusqu'à 240°C. La température est maintenue à 240°C pendant 15 min. Le volume d'injection est de 2 µL avec un ratio de split 2 : 1. Les analyses sont réalisées à débit constant.

3. Analyse quantitative des COV par CPG-DIF

La quantification des COV par CPG-DIF a été réalisée grâce à une méthode d'étalonnage interne. Cette méthode consiste à calculer pour chacun des COV étudié le rapport d'étalonnage. La formule est $REI = SE / SEI$ dans une gamme de concentration (avec REI : rapport d'étalonnage interne, SE : surface du pic de l'étalon de COV et avec SEI : surface du pic de l'étalon interne). Les solutions étalons hexane/COV sont préparées à 1, 5, 10, 25, 50 mg/L. Des droites d'étalonnages sont obtenues et présentées dans le Tableau 9. Elles permettent de calculer la concentration de chacun des COV qui est exprimée en µg/L.

Tableau 9 : gammes d'étalonnages ; r^2 : coefficient de corrélation ; RSD : Residuel standard deviation ; y : rapport d'étalonnage; x : concentration en mg / L ; a : pente de la droite ; b : bruit de fond de l'appareil.

Nom des composés	$y=ax+b$	r^2	RSD
α -pinène	$y=14,69x+16,22$	0,99	36,25
Hexanal	$y=6,37x-1,43$	0,98	36,56
β -pinène	$y=25,57x+97,47$	0,99	112,51
Trans-2-hexénal	$y=16,82x-1,13$	0,99	3,80
3-hexényl acétate	$y=15,42x+31,26$	0,99	36,53
Cis-3-hexén-1-ol	$y=18,48x+3,73$	0,99	2,66
β -caryophyllène	$y=16,28x-13,77$	0,99	12,65
Germacrène D	$y=8,98x+17,17$	0,99	18,43
Phényléthanol	$y=25,64x-161,23$	0,98	229,67
Farnésol	$y=6,33x-65,58$	0,96	81,09
Eugénol	$y=19,76x+8,53$	0,96	191,48
DMT	$y=19,36x+48,86$	0,99	60,23
Dihydro- β -ionone	$y=2,79x-2,25$	0,96	23,76

III. Isolement des vésicules lipidiques

A. Extraction et isolement des vésicules lipidiques par gradient de saccharose

1. Pour l'étude de la composition en COV et en protéines

La technique effectuée a été mise au point à partir des protocoles utilisés pour isoler des oléosomes dans différents tissus ou organes (anthères, grains de pollens, graines) (Hsieh et Huang, 2005 ; Hudak et Thompson, 1996) et de travaux préliminaires du laboratoire sur les pétales de rose (M. Bouissière et S. Bonnard, non publié). Le broyage de 100 g de pétales de

roses est effectué dans 100 mL d'un tampon d'extraction (HEPES-NaOH 0,05 M pH 7,5, saccharose 0,8 M, Na₂EDTA 0,1 M) contenant du phénylméthylsulphonylfluoride (anti-protéases) à 30 µg/mL dans de l'isopropanol et du polyvinylpolypyrrolidone à 500 mg (piégeage des polyphénols). Les pétales sont broyés avec un mixeur commercial (20000 tours/min). Le broyat est filtré sur une membrane de nylon ayant des pores d'un diamètre de 100 µm. Cent mL de filtrat sont centrifugés à 9000 xg pendant 20 min à 4°C. Cent quatre-vingt mL d'une solution de saccharose à 0,4 M (Annexe 2) préparés à partir du tampon d'extraction HEPES-NaOH sont déposés sur le filtrat. Durant la centrifugation à 9000 xg pendant 3 h à 4°C, la fraction lipidique migre dans la solution de saccharose à 0,4 M. 1,5 mL de fraction vésiculaire sont récupérés ainsi que 1,5 mL de la fraction 0,8 et 1,5 mL de la fraction 0,4 M (Figure 17). La fraction vésiculaire est stockée à 4°C. La stabilité et l'intégrité des vésicules lipidiques sont d'environ une semaine dans ces conditions de stockage. Ces vésicules obtenues par ce protocole sont analysées en CPG-SM.

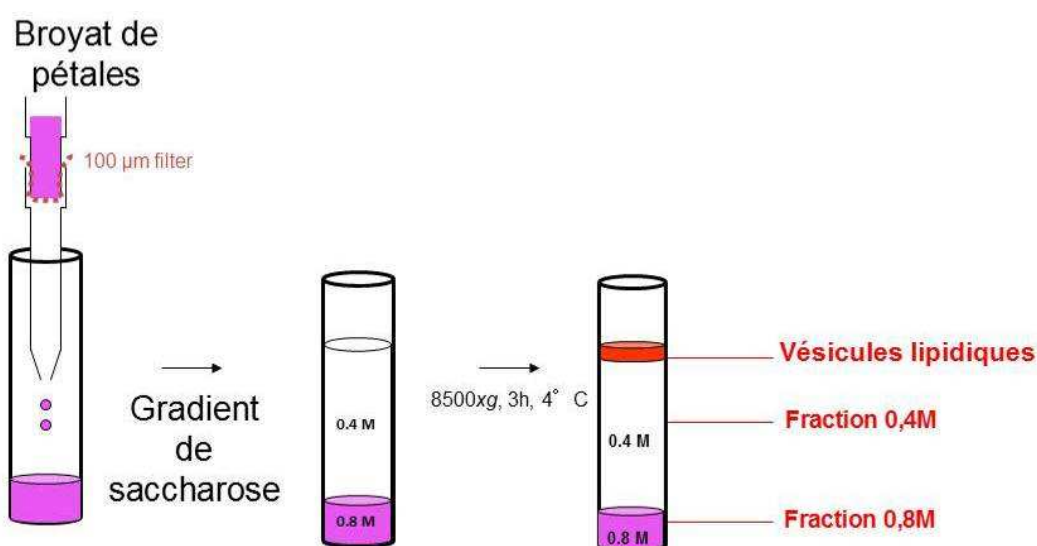


Figure 17 : schéma simplifié de l'extraction et de l'isolement des vésicules lipidiques par gradient de saccharose.

2. Pour l'étude de la composition lipidique

Pour l'analyse des lipides, des modifications sont apportées au protocole précédent. Trois solutions de saccharose à des concentrations différentes : 0,4 M, 0,2 M (Annexe 2) et tampon HEPES NaOH 50 mM pH 7,5 (Annexe 2) sont déposées sur le filtrat. Le volume de chacune des solutions est identique à celui du filtrat. La fraction vésiculaire est récupérée et migre à l'interface entre les solutions de saccharose de 0,4 M et 0,2 M.

IV. Analyse des lipides

A. Extraction et séparation des lipides en CCM préparative

La technique effectuée a été mise au point à partir d'un protocole pour analyser la composition lipidique de la matrice extracellulaire d'un champignon phytopathogène (Cooper et al., 2000). Ce protocole d'extraction et de séparation a été réalisé sur les graines d'églantier (contrôle positif) et sur les pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose'.

La phase mobile ou l'éluant, est composée d'hexane (78,6 %), de diéthyléther (19,6 %) et d'acide formique (2 %). Cent cinquante mL de cette solution sont déposés dans une cuve chromatographique en verre (23 cm x 23 cm x 10 cm). Le couvercle doit être bien fermé pour que la cuve se sature pendant 30 min. La phase stationnaire est un gel de silice (20 cm x 20 cm) sur un support en plastique (60 Å°, 250 µm d'épaisseur de couche) (60_{F254}, Merck).

Cent µL de vésicules à analyser sont mis en solution dans 100 µL de chloroforme. Après 1 min d'agitation sur un vortex, le chloroforme est évaporé jusqu'à un volume final de 10 µL. Des solutions à 25 g/L d'étalons dans du chloroforme sont préparées : DL- α -palmitine (Sigma-Aldrich, 542-44-9) dipalmitine (Sigma-Aldrich, 26657-95-4), trilinoléate de glycéryle (Sigma-Aldrich 537-40-6) et oléate d'arachildyle (Sigma-Aldrich 22393-88-0). Dix µL de solutions étalons et 10 µL de vésicules sont déposées sur la plaque de silice à l'aide d'un capillaire. La plaque est placée en position verticale dans la cuve. Le solvant migre sur la plaque pendant 50 min. La plaque est séchée pendant 1 min et révélée avec des vapeurs d'iode (I₂) pendant 5 min. Pour chaque composé identifié, un rapport frontal (R_f) est déterminé. Le rapport frontal est le rapport de la distance parcourue par le composé et de la distance parcourue par le front du solvant. L'identification des lipides est réalisée par comparaison du rapport frontal.

B. Analyse de la composition en CPG-SM

Les spots correspondants aux TG sont récupérés par grattage de la plaque de silice. Cette fraction est dissoute dans 4 mL d'un mélange de méthanol 65 % et de chloroforme 35 % pendant 5 min. L'ensemble est filtré sur de la laine de verre et rincée 3 fois avec 2 mL de chloroforme. Afin d'être analysés en CPG-SM, les acides gras sont estérifiés et méthylés selon la méthode suivante. Le solvant est totalement évaporé et les acides gras sont repris

dans 10 ml d'un mélange méthanol/acide sulfurique (1 % v/v d'acide sulfurique). La solution est chauffée à reflux pendant 30 min à 42°C. Le solvant est évaporé jusqu'à un volume final de 2 mL. Deux ml d'hexane et 2 mL d'eau sont ajoutés et homogénéisés. La phase organique (supérieure) est récupérée et analysée en CPG-SM.

C. Activité hydrolytique de la lipase sur les TG

L'utilisation de la lipase permet de confirmer la présence des TG dans les vésicules lipidiques. La technique effectuée a été mise au point à partir d'un protocole de caractérisation et purification d'une lipase d'*Aspergillus oryzae* hydrolysant spécifiquement les TG (Toida et al., 1998). Deux échantillons ont subi le traitement à la lipase :

les vésicules de graines d'égantier

les vésicules de pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose'

Les vésicules sont extraites par la méthode d'extraction et isolement des vésicules lipidiques par gradient de saccharose (III.A.2), puis stockées au congélateur à -20°C pendant 12 h. Quatre vingt µL de vésicules sont mis en solution avec 3 mL de tampon acétate à 50 mM à pH 5,5 (acide acétique à 0,1 M, acétate de sodium à 0,1 M) et 96 U de lipase (Fluka 9001-62-1). Une solution étalon est utilisée comme contrôle positif : 3 µL de trilinoléate de glycéryl dans 80 µL de chloroforme. Après agitation à 4000 xg à 25°C pendant 20 min, 3 mL de chloroforme sont ajoutés. Le tube est homogénéisé. La phase organique est récupérée et évaporée jusqu'à un volume final de 80 µL et sont déposés sur une plaque de silice. La révélation est réalisée à l'iode. Des taches orangées apparaissent. L'identification des lipides est réalisée par comparaison du rapport frontal.

V. Analyse protéique des vésicules lipidiques

A. Obtention des protéines totales des vésicules

Les vésicules sont extraites par la méthode d'extraction et isolement des vésicules lipidiques par gradient de saccharose. Dans ce cas, 3 mL de fraction vésiculaire est prélevé. A cette fraction est ajouté 10 % de glycérol, avant de la stocker pour une nuit au congélateur -80°C. Après lyophilisation pendant 12 h, les cristaux sont repris dans 100 µL d'eau ultrapure.

B. Electrophorèse des protéines en Nupage® pour analyse protéomique

Les extraits protéiques sont mélangés à 25 µL de tampon Lithium Dodecyl Sulfate 4X et à 10 µL d'agent réducteur Nupage® 10X et sont chauffés pendant 10 min à 70°C. Les protéines sont déposées sur un gel d'acrylamide-bis-acrylamide à 4 % de concentration et un gel de séparation à 10 % (Nupage® Novex Bis-Tris gels, Invitrogen). La migration se fait dans un tampon de migration (200 mL de MES 1X (2-(N-morpholino) acide sulfonique-éthane) et 500 µL d'antioxydant Nupage®) pendant 35 min à 200 V et 100 mA. Le gel est coloré dans 20 mL d'Instantblue (Expedon). Les bandes protéiques sont révélées au bout de 10 min. Les protéines sont analysées en LC-nano ESI-MS/MS après action de la trypsine.

C. Identification des protéines en chromatographie liquide en LC-nano ESI-MS/MS

L'identification des protéines est réalisée par le centre commun de microséquençage des protéines (CCMP, IFR 128, IBCP, Lyon). Les bandes sont découpées du gel et décolorées par 50 mM de bicarbonate d'ammonium /acétonitrile (50/50 v/v). Les protéines sont réduites pendant 40 min à 56°C avec 10 mM de dithiothréitol, alkylées pendant 30 min à l'obscurité avec 100 mM d'iodoacétamide et soumise à la protéolyse par la trypsine (le rapport protéine/trypsine doit être de 1/10). L'extraction des différents peptides générés par la digestion se fait avec une solution eau/acétonitrile (50/50) avec 1% d'acide formique. Après diffusion passive des peptides entre les morceaux de gel et le tampon, l'acétonitrile en excès est évaporé dans un appareil Speedvac. L'échantillon est repris dans 10 µL d'acide formique 1%. La technique d'analyse utilisée pour ce séquençage est la LC-nano ESI-MS/MS permettant d'obtenir pour chaque peptide, par l'analyse de ses fragments, sa masse et sa séquence. Les peptides obtenus sont séparés sur une nano-colonne de chromatographie liquide (colonne de 75 mm, phase inverse C18). Dès que les peptides sont élués de la colonne, ils sont analysés par le qQ-TOF (analyseurs quadrupole et temps de vol) en mode ESI (ionisation par electrospray). Ces informations sont utilisées pour interroger les banques de données (Swissprot/NCBI) grâce au logiciel ProtinePilot™.

VI. Techniques cytologiques

A. Mise en évidence des lipides

La coloration au Nile Red (Sigma-Aldrich) permet de mettre en évidence les lipides, et plus spécifiquement les lipides neutres, généralement intracellulaires comme les TG. Les lipides composant les vésicules sont colorés en jaune. A 1 mL de fraction vésiculaire est ajouté : 300 μ L tampon phosphate de 10 X, 3 μ L de Nile Red (solution à 1 mg/mL; solution réalisée dans l'acétone). Après une incubation de 10 min de coupes fraîches à main levée dans l'obscurité, les vésicules sont observées en microscopie à fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 450-500 nm.

B. Mise en évidence des terpènes

La coloration par le réactif de NaDi a été mise au point par David et Carde (1964). Elle est réalisée sur coupes fraîches à main levée. Ce réactif permet de mettre en évidence les terpènes ou toutes substances lipophiles en leur donnant une couleur violette. Il ne permet pas de révéler les composés aromatiques tels que le 2-phényléthanol. Le réactif de NaDi est un mélange extemporané d'une solution alcoolique d' α -naphthol 1 % (m/v) dans de l'éthanol à 40 % et d'une solution aqueuse de N-N-diméthyl-p-phénylènediamine-dihydrochloride 1 % (m/v) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,2 (0,5/0,5/49 ; v/v/v). La fraction vésiculaire des pétales de roses *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' est placée dans le réactif de NaDi pendant 30 à 60 min à l'obscurité et observée en microscopie optique toutes les 10 min durant l'évolution de la réaction.

C. Expression transitoire dans les pétales de roses

1. Transformation par infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens*

L'infiltration des pétales de rose a été adaptée d'après le protocole de Batoko et al, (2000). Une colonie isolée est utilisée pour ensemercer 3 mL de milieu LB (Annexe 3) contenant les antibiotiques adéquats (Annexe 3). La culture est incubée pendant 24 h à 28°C jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. La suspension bactérienne est diluée de façon à ajuster la concentration de l'inoculum à une DO de 0,5 à 600 nm. Les 3 mL de culture sont

centrifugés à température ambiante pendant 5 min à 4000 xg, puis le culot est rincé une fois avec 1 mL de tampon d'induction (Annexe 3). Après une centrifugation de 5 min à 4000 xg, le culot est repris dans 5 mL de ce même tampon. La souche bactérienne contenant le gène codant pour la protéine P19 et la souche bactérienne contenant le gène d'intérêt sont mélangés volume à volume. L'infiltration de la suspension bactérienne est réalisée avec une seringue sans aiguille après avoir effectué une petite blessure sur les pétales de roses. Les roses 'Akito' sont achetées au stade BO à BTO, puis mises en vase avec un complément d'élément nutritif à 10 g/L (Chrysal professional 3). Les observations sont faites 3 jours après l'infiltration en microscopie confocal à fluorescence à une longueur d'excitation de 488 nm (microscope droit avec filtre DD488/543, objectif X40 à eau) (Wolinski et Kohlwein, 2008).

VII. Techniques de biologie moléculaire

A. Extraction d'ARN total de pétales de roses

Les ARN de pétales de roses ont été extraits avec le kit 'total RNA purification from the plant'® (Macherey-Nagel). Une seule modification a été apportée à ce protocole : 200 mg de pétales et 60 mg de polyvinylpyrrolidone PVP40 (Sigma, 9003-39-8) sont broyés dans l'azote liquide, puis sont additionnés de 2 mL de RAP et 20 µL de β-mercaptoéthanol. Le broyat est déposé sur le filtre NucleoSpin® (colonne violette) et une centrifugation à 11000 xg pendant 1 min est réalisée. Le filtrat est additionné volume à volume avec de l'éthanol à 70 % et mélangé en agitant sur Vortex pendant 1 min. L'ensemble est placé sur une colonne NucleoSpin® de couleur bleue. Après centrifugation à 11000 xg pendant 1 min, les ARN sont fixés sur la colonne et 350 µL de MDB (« membrane desalting buffer ») sont additionnés. Après une centrifugation à 11000 xg pendant 1 min, 95 µL de DNase sont déposés sur la colonne et l'ensemble est incubé pendant 15 min à température ambiante. Trois lavages successifs sont effectués avec deux tampons différents RA2 et RA3. Les ARN sont lavés avec 200 µL de RA2. Après une centrifugation de 11000 xg pendant 1 min, 600 µL de tampon RA3 est additionnés. Cette étape est réalisée deux fois, seul le volume du tampon RA3 change (250 µL). Après une centrifugation à 11000 xg pendant 2 min, 40 µl d'eau stérile sont déposés au centre de la colonne. Après une centrifugation à 11000 xg pendant 1 min, les ARN sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm et conservés à -80°C.

B. Obtention d'ADN complémentaire

1. Traitement à la DNase

Dans un volume de 100 μ L, 10 μ g d'ARN sont additionnés de tampon DNase RQ1 10X (Promega) (Annexe 4), 5U de DNase RQ1 (Promega) et 40 U d'inhibiteur de RNase RNasin® (Promega). Le mélange réactionnel est incubé pendant 1 h à 37°C. A l'issue, 100 μ L d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) à pH 8 sont ajoutés, puis une centrifugation à 13000 xg pendant 10 min à 4°C est réalisée et la phase aqueuse est récupérée. Cette étape, effectuée deux fois, permet l'élimination des protéines. Les ARN sont précipités avec 1/10 du volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,8) et 2 volumes d'éthanol absolu, pendant 12 heures à -20°C. Après 30 min de centrifugation à 13000 xg à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 100 μ L d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à nouveau pendant 10 min à 13000 xg à 4°C. Cette étape de lavage est réalisée deux fois. Les culots d'ARN obtenus sont séchés sous la hotte Sorbone, puis repris dans 10 μ L d'eau stérile. Les ARN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm et conservés à -80°C.

2. Réaction de reverse-transcription.

Deux μ g d'ARN totaux sont additionnés de 0,5 μ g d'oligo (dT) 15 (Promega) dans un volume final de 11 μ L puis dénaturés 5 min à 70°C. Cette étape permet d'éliminer les structures secondaires des ARN messagers qui pourraient gêner la reverse-transcription. Puis le mélange réactionnel est placé immédiatement dans la glace pendant 30 sec. La réaction de reverse-transcription est réalisée en ajoutant, pour un volume total de 25 μ L, le tampon M-MLV 5X (Annexe 4), 0,5 mM de dNTP, 30 U de RNase inhibiteur (Promega), 200 U de reverse transcriptase M-MLV. Le mélange est ensuite incubé à 42°C pendant 1 h, puis 5 min à 95°C pour inactiver la reverse transcriptase. Les ADNc simple brin obtenus sont conservés à -20°C.

C. Techniques d'amplification d'ADNc par PCR

1. Définition des amorces pour les PCR

Afin d'évaluer l'expression du gène *RhPAAS*, des RT-PCR semi quantitatives ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques. La séquence du gène *RhPAAS* étant disponible dans les banques de données pour la *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' (numéro d'accèsion DQ192639), des amorces spécifiques ont pu être définies (Tableau 10 et Annexe 5).

Tableau 10 : couples d'amorces utilisés pour amplifier des fragments d'ADN correspondant au gène *RhPAAS*. S : amorces sens ; AS : amorces antisens.

Gène cible	Amorces	Séquences 5'-3'
<i>RhPAAS</i>	PAAS-S1	GGTAGCTTCCCATTCCACAG
	PAAS-AS1	AGAGCGGCACTAGACCTTTT
	PAAS-S2	TTCCGGGCCATCAAGACTAC
	PAAS-AS2	ATTCCAAGCCTCGACTATGTG
	PAAS-S4	TCGATCTGTCTTTCTAGCCTTT
	PAAS-AS4	CCAGCACAGAGATTGAAGCA

2. RT-PCR semi-quantitative

Les réactions de RT-PCR semi-quantitative nécessitent une normalisation des ARN de tous les échantillons. Le gène GAPDH de rose s'exprime à un niveau équivalent quel que soit le tissu ou le stade de développement considéré. En utilisant une quantité fixe d'ARNm de GAPDH, on utilise donc une quantité fixe d'ARNm totaux. L'ARNm de GAPDH a donc été choisi pour normaliser tous les échantillons. Parallèlement, des oligonucléotides spécifiques sont définis à partir des séquences des gènes isolés afin d'amplifier une fraction du gène. Une PCR est réalisée dans les mêmes conditions sur les échantillons normalisés grâce au gène de la GAPDH.

Chaque réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un volume final de 20 µL contenant le tampon de réaction de la GoTaq® 5X (Promega) (Annexe 4), 0,1 mM de dNTP, 0,5 mM d'amorce sens, 0,5 mM d'amorce antisens, 0,5 U GoTaq® (Promega) et 1 µL d'ADNc ; le volume est ajusté à 20 µL avec de l'eau ultrapure. Le programme de PCR utilisé permet une dénaturation initiale (5 min à 95°C), puis 30 cycles d'amplification (30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C, 1 min 30 sec à 72°C) et une étape d'élongation finale (5 min à 72°C).

Les produits d'amplification sont additionnés de tampon de charge TAE 1X (Annexe 4) et sont séparés sur gel d'agarose à 1,2 % contenant 0,6 µL/mL de BET dans un tampon TAE 1X. L'intensité de chaque signal est estimée visuellement. Différentes dilutions des échantillons d'ADNc sont utilisées jusqu'à avoir des signaux d'intensité identique pour tous les échantillons utilisés.

3. PCR « fidèle » pour l'obtention de séquences de gènes

Les PCR « fidèles » sont réalisées avec une polymérase hautement fidèle (Phusion, Finnzymes). Le mélange PCR de 20 µL est composé du tampon de réaction 5X, 0,2 mM de

dNTP, 0,5 mM d'amorce sens et antisens, 0,4 U de polymérase. Le programme de PCR utilisé permet une dénaturation initiale (1 min à 98 °C) puis 30 cycles d'amplification (10 sec à 98 °C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 72°C) et une étape d'élongation finale pendant 5 min à 72°C. La phase d'élongation est ajustée en fonction de la taille du fragment à amplifier (1 min pour 1000pb). Une fraction d'aliquote est déposée sur un gel d'agarose à 1,5 %.

La polymérase Phusion possède une activité exonucléase en 3'. Pour cloner un fragment amplifié avec ce type de polymérase, il est nécessaire d'utiliser la GoTaq®, qui avec des dATP, permettra d'ajouter des groupements adénosine aux extrémités du fragment amplifié, permettant ainsi de fabriquer des extrémités cohésives à séquences connues, donc plus faciles à cloner. A 5 µL de produit PCR amplifié, sont ajoutés 5 U de GoTaq® (Proméga), 0,4 mM de dATP et le tampon de réaction de l'enzyme 5X. L'ensemble est placé 30 min à 70°C. Le fragment PCR obtenu est ensuite ligué dans le plasmide PGEM-T easy comme décrit dans le paragraphe D.1.

4. PCR quantitative

Toutes les expérimentations ont été menées sur des ADNc en plaques optiques 96 puits (Multiplate PCR Plates Low 96-well Clear, Biorad) avec l'Opticon 4 Real Time PCR Detector (Biorad). Pour chaque réaction de PCR, 3 µL d'ADNc dilué au 1/50, 0,45 µL d'amorce sens et antisens (10 µM) (Tableau 11), 7,5 µL de IQ SYBR Green Supermix 2X (Biorad) et 3,6 µL d'eau sont mélangés pour obtenir un volume final de 15 µL. Les paramètres de PCR sont : 95°C, 3 min ; 40X (95°C, 15 min ; 60°C, 1 min). La mesure de la fluorescence se fait à chacune des étapes des 40 cycles. Après la réaction de polymérisation en chaîne et afin de confirmer la spécificité de l'amplification, les produits PCR sont soumis à une analyse de leur courbe de dissociation. Le programme suivant est utilisé : 95°C, 15 sec ; 60°C, 20 sec ; augmentation progressive de la température jusqu'à 95°C pendant 20 min (à raison de 1,75°C/min) ; 95°C, 15 sec ; les données sont collectées au cours de la montée en température, puis elles sont analysées grâce au logiciel MJ OpticonMonitorTM Analysis Software version 3.1 (Biorad).

Tableau 11 : couples d'amorces utilisés pour amplifier des fragments d'ADN correspondant aux gènes *RhPAAS* et *TCTP*. S : amorces sens ; AS : amorces antisens.

Gène cible	Amorces	Séquences 5'-3'
<i>RhPAAS</i>	RhPAAS-S5	AACCGCCACCACCCTGCTATTG
	RhPAAS-AS5	CCTCTACGCCGTTAATGAAATG
<i>TCTP</i>	Q-TCTP-S1	GAGGGAGCAACCAAGTTTCTG
	Q-TCTP-AS1	TGTAGTAGGCAAAGACCAAAGC

D. Techniques de clonage

1. Clonage de fragments dans le vecteur pGEM®-T easy (Promega)

Le clonage des gènes, dans le vecteur pGEM®-T easy de Promega (Figure 18), se fait au niveau d'un site multiple de clonage situé à l'intérieur du gène *lacZ*, codant pour la β -galactosidase : ceci permet une sélection blanc-bleu des clones ayant intégré l'insert.

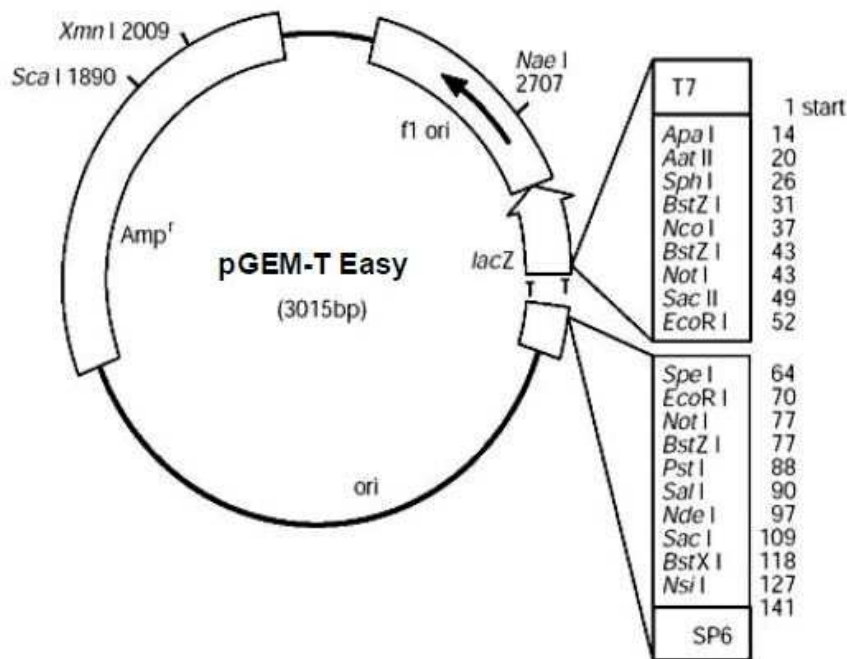


Figure 18 : carte du vecteur de clonage pGEM-T easy (Promega).

La réaction de ligation des produits PCR dans le pGEM®-T easy est réalisée dans un volume final de 10 μ L contenant le tampon de ligation 2X (Annexe 4), 50 ng du vecteur, 3 U d'ADN ligase T4 et 1,5 μ L d'insert. Afin de s'assurer d'une bonne efficacité de la ligation, l'insert est

concentré en respectant un rapport insert/vecteur de 3 : 1, en accord avec les instructions du kit. La ligation dans le vecteur pGEM®-T easy se fait pendant une nuit à 4°C.

2. Transformation des bactéries JM109 pour le clonage, la multiplication et la conservation des gènes.

Deux µL d'une réaction de ligation sont ajoutés à 50 µL de bactéries compétentes, *Escherichia coli* JM 109 (kit pGEM®-T easy vector system II, Promega). L'ensemble est placé 20 min dans la glace, puis incubé 50 sec à 42°C pour transformer les bactéries par choc thermique. Après passage de 2 min dans la glace, les bactéries sont transférées dans 950 µL de milieu SOC (Annexe 4). Elles sont incubées à 37°C pendant 1h30 sous agitation à 200 xg, pour permettre leur multiplication et l'expression du gène de résistance. Cent µL de bactéries sont étalées sur milieu LB agar (Annexe 3) avec de l'ampicilline à 100 µg/mL, de l'IPTG à 0,5 mM et du 5-Br-4-Cl-β-D-galacturonide à 50 µg/mL, et placées une nuit à 37°C. Les bactéries comportant un plasmide recombinant formant des colonies blanches, sont prélevées et mises en culture pendant une nuit dans 3 mL de milieu LB (Annexe 3) avec de l'ampicilline à 100 µg/mL. Pour vérifier la taille des inserts, des amorces universelles (Tableau 12) bordant le site multiple de clonage du vecteur pGEM®-T easy sont utilisées.

Tableau 12 : couples d'amorces utilisés pour vérifier la taille de l'insert *RhPAAS*.

Amorces	Séquences 5'-3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAA

3. Extraction de plasmides par lyse alcaline

Deux mL de culture bactérienne sont centrifugés pendant 2 min à 5000 xg. Le culot bactérien est repris avec 100 µL d'une solution de lyse (glucose 50mM ; EDTA 10 mM pH 8 ; Tris-HCl 25 mM pH 8 ; lysozyme 4 mg/mL) et incubé 5 min à température ambiante. Après la lyse des bactéries, 200 µL d'une solution de SDS 1% (m/v) et NaOH 0,2 M sont ajoutés. L'ensemble est incubé 5 min dans la glace, puis additionné de 150 µL d'une solution d'acétate de potassium 3 M ajusté à pH 4,8 avec de l'acide acétique glacial et placé à nouveau dans la glace pendant 5 min. Après une centrifugation à 12 850 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré et 500 µL d'une solution de phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (25 : 24 : 1) sont ajoutés. Une centrifugation de 5 min à 12850 xg est réalisée, puis la phase aqueuse est

récupérée et additionnée de 1 mL d'éthanol absolu. L'ensemble est laissé 5 min à température ambiante pour permettre la précipitation de l'ADN. Après 5 min de centrifugation à 12 850 g, le surnageant est éliminé et le culot est lavé par 1 mL d'éthanol à 70 %, puis séché sous la hotte Sorbone. Le culot obtenu est repris dans 50 µL d'une solution de Tris-RNase (Tris 10 mM pH 8; RNase A 40 µg/mL) et conservé à -20°C. Le séquençage des plasmides a été réalisé par la société MWG (Eurofins MWG operon, Ebersberg, Germany).

4. Vérification de la qualité des ADN par spectrophotométrie.

La concentration d'acides nucléiques estimée est définie par une mesure de la densité optique à 260 nm, en admettant que 1 unité de DO à 260 nm équivaut à 40 µg/mL d'ARN ou 50 µg/mL d'ADN. La pureté est estimée par une mesure de DO à 280 (contamination des protéines) et 230 nm (contamination des polysaccharides). Des rapports $DO_{260\text{ nm}}/DO_{230\text{ nm}}$ et $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$ proches de 2 indiquent une bonne purification des acides nucléiques.

VIII. Analyse informatique et/ou statistique des données

La recherche de la séquence *RhPAAS* est réalisée dans les banques de données du National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La recherche d'homologies dans les banques de données générales est effectuée à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les alignements multiples d'ADN sont réalisés avec le logiciel CLUSTAL W du logiciel BioEdit (Hall et al., 1999) version 7.0.5.3 (Paramétrages : options full multiple alignement). Pour affiner l'alignement des séquences entre elles, quelques corrections manuelles ont été effectuées.

Le logiciel Primer3 Plus est utilisé pour définir des amorces spécifiques (Untergrasser et al., 2007). Pour vérifier la dimérisation éventuelle des amorces, le logiciel PerlPrimer est utilisé.

Pour le test du χ^2 , les valeurs des produits détectés en CPG sont converties en pourcentage des COV totaux. Si un composé est à l'état de trace, sa valeur est fixée arbitrairement à 0,001 µg équivalent camphre/g_{PF}

Caractérisation des oléosomes de pétales de rose par fractionnement cellulaire : résultats

I. Caractérisation de la fraction lipidique des pétales de rose

Dans ce travail, nous cherchons à caractériser les vésicules observées dans les pétales de roses. Des travaux antérieurs (Bergougnoux et al., 2007) ont en effet mis en évidence la présence de nombreuses vésicules lipidiques d'environ 1 μm de diamètre, souvent à proximité de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme de pétale de rose, ainsi que des vésicules plus volumineuses renfermant des terpènes. Il semblerait que ces particules soient des oléosomes ou des vésicules de bourgeonnement de la membrane plasmique (Hudak et Thompson, 1996 et 2000). Leur particularité est la présence de certaines protéines telles que les oléosines et de lipides caractéristiques, les TG. Ainsi, pour démontrer cette hypothèse, une étude de la composition en lipides et en protéines des vésicules est proposée. Nous cherchons également à montrer si ces vésicules sont impliquées dans le stockage des COV. Pour localiser ces COV à l'intérieur des vésicules de pétales de roses, des colorants spécifiques et une analyse en CPG sont utilisés.

A. Etude histochimique sur pétales frais

Afin de mettre en évidence des COV particuliers les terpènes à l'intérieur des cellules de l'épiderme supérieur du pétale et de préciser leur localisation vésiculaire ou non, la coloration au NaDi a été mise en œuvre sur les pétales frais de roses parfumées *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose'. Les vésicules lipidiques contenant des terpènes apparaissent alors en violet. Les résultats montrent que dans les cellules coniques de l'épiderme supérieur d'un pétale de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' connues pour produire des terpènes, des vésicules colorées en violet sont observées en microscopie optique, confirmant la présence d'un contenu terpénique (Figure 19A). Ce résultat confirme celui obtenu par Bergougnoux et al. (2007). Ce même pétale préalablement coloré au Nile Red qui marque spécifiquement des

lipides neutres, c'est-à-dire le plus souvent des TG, montre des vésicules lipidiques colorées en jaune (Figure 19B). Une superposition des images obtenues avec les deux “colorants” indique que les vésicules sont de nature lipidique et contiennent des terpènes (Figure 19C).

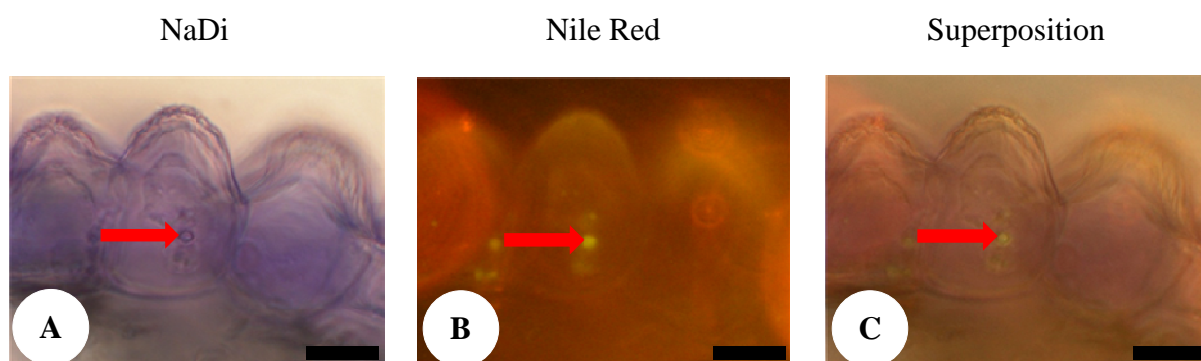


Figure 19 : micrographie optique : A) après une coloration avec le réactif de NaDi. La flèche rouge indique une vésicule contenant des terpènes. B) après une coloration au Nile Red. La flèche rouge indique une vésicule lipidique. C) superposition des images A et B. Les colorations sont réalisées sur des pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. Les barres représentent une échelle de 10µm.

B. Extraction des vésicules lipidiques des pétales

Les vésicules lipidiques du cytosol des pétales de rose ont été isolées par flottaison dans un gradient de saccharose (Figure 20). Cette technique a été mise au point au laboratoire en se basant sur des travaux préliminaires de Master de M. Bouissière et S. Bonnard et à partir des protocoles utilisés pour isoler des vésicules lipidiques dans les pétales d'œillet (Hudak et Thompson, 1996). Pour avoir une quantité suffisante de vésicules, 100 g de pétales de roses *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' ont été nécessaires.



Figure 20 : anneau de vésicules obtenu après extraction sur gradient de saccharose.

Afin de vérifier que les vésicules observées au microscope (Figure 19) sont bien extraites, les mêmes colorations au réactif de NaDi et au Nile Red ont été réalisées sur la fraction lipidique

et sur le tampon 0,4 M juste au-dessous de cette fraction. Avec le réactif de NaDi quelques vésicules colorées en violet sont observées dans la fraction lipidique (Figure 21A) mais pas dans le tampon 0,4 M (Figure 21B). Ces vésicules ont une taille de près de 2 μm . Avec le Nile Red, de très nombreuses vésicules jaunes sont observées dans la fraction lipidique (Figure 22A) mais pas dans le tampon 0,4 M (Figure 22B). Ces vésicules ont une taille de 0,6 à 1,3 μm mais plus rarement proches de 2 μm . Il semble donc que les vésicules contenant des terpènes forment une sous-population de vésicules lipidiques. Ce résultat est à mettre en parallèle avec l'observation des vésicules lipidiques, donc colorables au Nile Red, dans tous les tissus du pétale mais l'observation de vésicules positives au NaDi uniquement dans les épidermes. Il a aussi été démontré que la biosynthèse des COV ne se faisait que dans les épidermes (Bergougnoux et al., 2007).

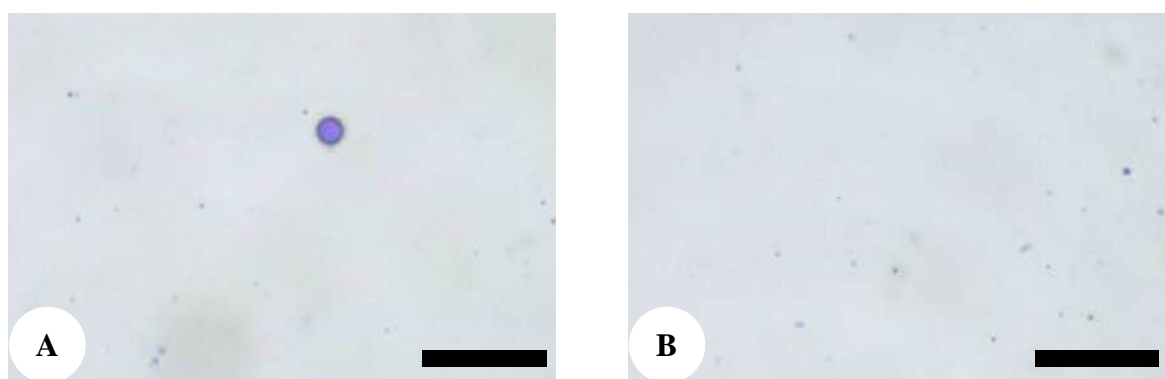


Figure 21 : A) micrographies optiques après coloration avec le réactif de NaDi des vésicules des pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. La barre représente une échelle de 10 μm . B) Micrographies optiques après coloration avec le réactif de NaDi de la fraction 0,4 M du gradient de saccharose des pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. Les barres représentent une échelle de 10 μm .

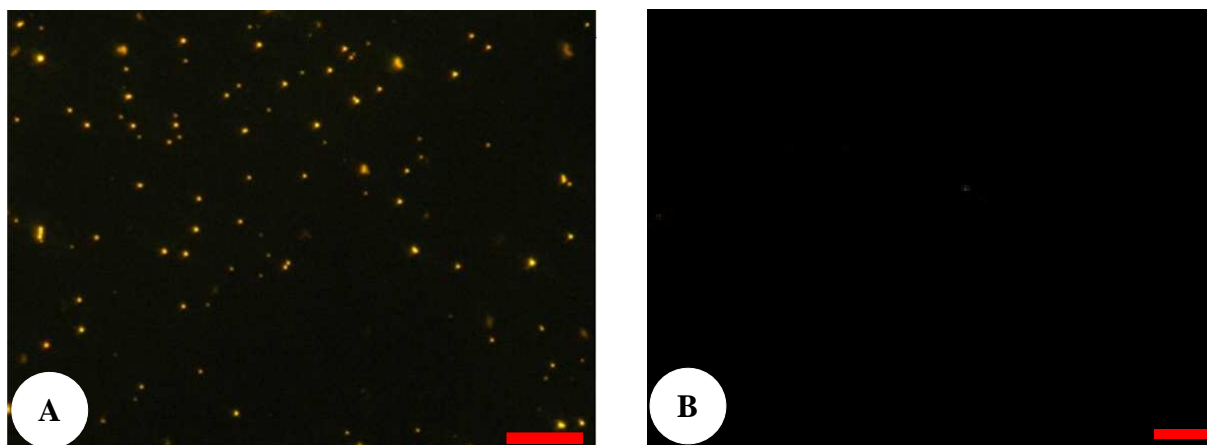


Figure 22 : A) micrographie optique du culot des vésicules isolées sur la variété *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' coloré au Nile Red. La barre d'échelle représente 20 μm . B) Micrographie optique de la fraction 0,4 M du gradient de saccharose colorées au Nile Red. Les barres d'échelle représentent 20 μm .

En conclusion, cette technique de fractionnement cellulaire permet de séparer les vésicules lipidiques du reste du pétale. Elles sont situées uniquement au dessus de la fraction 0,4 M. Cependant, il faut noter que la réaction au NaDi, même si elle est donnée pour être spécifique des terpènes, doit être considérée comme une indication et d'autres preuves convergentes devront être amenées. Le même type de remarque doit être formulé pour la coloration au Nile Red : elle est spécifique des lipides neutres mais il faudra démontrer que, dans les pétales, les lipides neutres sont essentiellement composés de TG. Ces résultats sembleraient pourtant indiquer que les COV produits dans les épidermes pourraient s'accumuler dans les vésicules lipidiques des cellules épidermiques.

C. Composition lipidique des vésicules de pétales de rose

Pour démontrer que les vésicules sont des oléosomes, il faut prouver qu'elles sont constituées de TG enveloppés d'une hemi-membrane de phospholipides.

Les oléosomes de graines contiennent typiquement 92 à 98 % de TG (Huang, 1992) enveloppés d'une hemi-membrane de phospholipides (1 à 4 %). Afin de déterminer la composition lipidique des vésicules de pétales de rose *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose', les lipides totaux ont été extraits par une solution de chloroforme et séparés par CCM (Figure 23).

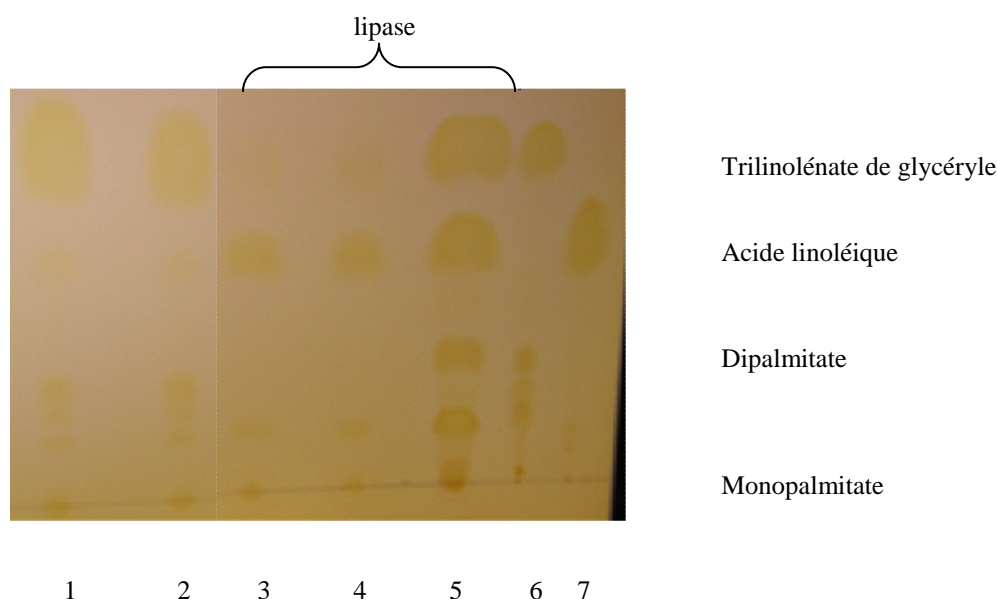


Figure 23 : séparation des lipides de la fraction vésiculaire de graines et de pétales par CCM. A droite de la CCM, des standards : monopalmitate, dipalmitate, acide linoléique et trilinoléate. Les pistes 1 et 3 correspondent à la fraction vésiculaire de pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' respectivement sans et avec lipase. Les pistes 2 et 4 correspondent à la fraction vésiculaire de graines de *R. canina* respectivement sans et avec lipase. Les pistes 5, 6 et 7 correspondent aux standards. La piste 5 correspond à l'action de la lipase sur le trilinoléate de glycéryle.

Les standards déposés sur la plaque de silice représentent différentes classes de lipides. L'acide linoléique représente les acides gras libres, le monopalmitate, les monoglycérides, le dipalmitate, les diglycérides et le trilinoléate de glycéryle, les triglycérides. Les vésicules lipidiques de graines d'églantier sont des oléosomes et ont la caractéristique de contenir une grande quantité de TG. Ces vésicules de graines sont donc un contrôle positif ce qui est confirmé par l'examen de la Figure 23 qui montre la présence des TG dans les oléosomes. La présence tout à fait naturelle des acides gras libres est également notée.

L'identification des lipides est réalisée par comparaison de rapport frontal (Rf) en utilisant les quatre solutions étalons de standards. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 13). Les plus importants dans notre étude sont l'acide linoléique avec un Rf de 0,5 et le trilinoléate de glycéryle avec un Rf de 0,7.

Tableau 13 : résultats des Rf des standards de migration sur CCM.

	Rf
DL- α -palmitine	0,02
Dipalmitine	0,10
Acide linoléique	0,50
Trilinoléate de glycéryle	0,70

Pour les vésicules de pétales, un spot majoritaire est observé sur la plaque de silice qui comigre avec le trilinolénate de glycéryle ($R_f = 0,7$) et les oléosomes de graines d'églantier, ce qui permet d'affirmer que les vésicules de pétales de roses contiennent des TG.

Pour confirmer la présence des TG dans les vésicules, une lipase d'*Aspergillus oryzae* est testée sur les vésicules de graines et de pétales. Cette lipase a pour caractéristique d'hydrolyser spécifiquement les TG en acides gras libres. Un contrôle positif d'action de la lipase est effectué en digérant le standard trilinolénate de glycéryle. Un nouveau spot apparaît comigrant avec l'acide gras libre, l'acide linoléique ($R_f = 0,5$). Après action de la lipase sur les extraits lipidiques totaux des vésicules de graines et de pétales, un spot majoritaire est observé sur la plaque de silice comigrant ($R_f = 0,5$) avec l'acide linoléique alors que la tache correspondant au TG a disparu. Ces expériences permettent d'affirmer que les vésicules des pétales contiennent majoritairement des TG qui sont des lipides neutres.

Afin de connaître la composition en acides gras des TG, ces lipides sont estérifiés et méthylés. Les esters méthyliques d'acide gras obtenus sont volatils et peuvent ainsi être analysés en CPG-SM. L'expérience est réalisée trois fois afin de confirmer les résultats (Tableau 14).

Tableau 14 : composition en acides gras des vésicules de graines et de pétales. La moyenne des trois valeurs obtenues représente les pourcentages de l'aire du pic total des chromatogrammes de CPG-SM. Le pourcentage de l'acide gras est calculé par rapport aux acides gras totaux.

	Graines	Pétales
Acide myristique C14:0	2 %	4 %
Acide palmitique C16:0	24 %	37 %
Acide stéarique C18:0	40 %	38 %
Acide oléique C18:1	15 %	10 %
Acide linoléique C18:2	7 %	8 %
Acide arachidique C20:0	12 %	3 %

La comparaison entre les vésicules de graines d'égantier et les vésicules de pétales de rose montre une similarité dans la composition des acides gras. Trois classes d'acides gras sont retrouvées dans les vésicules de pétales :

les acides gras saturés : C14, C16, C18, C20

les acides gras mono-insaturés tels que C18:1

les acides gras poly-insaturés tels que C18:2

Cette composition des vésicules de pétales en acides gras est une composition typique des oléosomes de graines. Par exemple, les huiles de tournesol contenant des oléosomes possèdent une haute proportion de C16, C18:1, C18:2 (Dyer et al., 2008), ce qui est en accord avec nos résultats. Les vésicules des pétales de rose contiennent donc des TG caractéristiques des oléosomes.

En conclusion, notre technique d'extraction par gradient de saccharose a permis de récupérer la fraction vésiculaire observée en microscopie. Les vésicules lipidiques contiennent des TG caractéristiques de ceux des oléosomes de graines d'égantiers ce qui semble indiquer la présence de ces derniers dans les pétales. Pour confirmer cette théorie, des marqueurs protéiques de ce compartiment ont été recherchés.

II. Recherche de caractéristiques propres aux d'oléosomes

Pour démontrer la présence d'oléosomes dans les pétales de roses, un protéome a été réalisé sur la fraction de vésicules afin de connaître leur composition générale en protéines et de la comparer aux protéomes d'oléosomes disponibles dans la bibliographie, avec en particulier, la présence ou l'absence de protéines marqueurs.

A. Recherche de marqueurs protéiques

Pour l'analyse protéomique, 500 g de pétales ont été traités selon le protocole de fractionnement cellulaire mis au point précédemment. Pour faciliter la récupération de la fraction lipidique vésiculaire, le tampon 0,2 M du gradient a été supprimé. Après avoir extrait et mis en suspension les protéines, un gel d'électrophorèse en 1D de type SDS-PAGE a été réalisé pour séparer, en fonction de leur masse, les différentes protéines qui composent les vésicules, puis coloré à l'Instantblue (Figure 24).

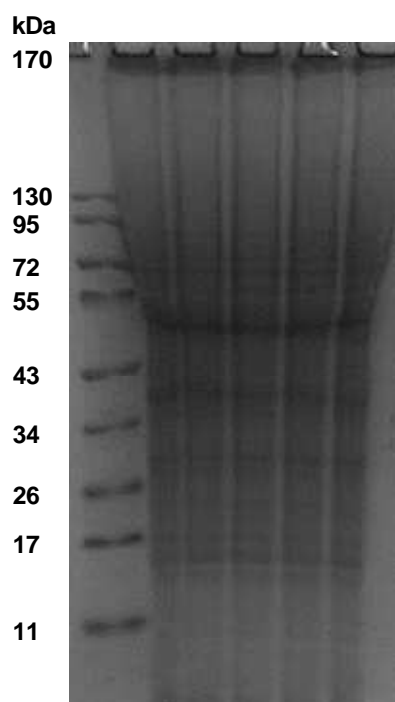


Figure 24 : séparation des protéines de la fraction vésiculaire de pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' par électrophorèse de type Nupage coloré à l'Instanblue. Les protéines sont déposées dans 5 puits à cause du volume important de l'extrait. L'expérience est réalisée deux fois. L'échelle de poids moléculaire PageRuler (Fermentas), 5 μ L.

Des bandes correspondantes à des protéines vésiculaires de tailles variables allant de 15 à 95 KDa sont observées. Les bandes correspondant à des tailles inférieures à 15 KDa et supérieures à 95 KDa ne sont pas prises en compte dans notre étude car leur intensité est trop faible pour être ensuite détectées par chromatographie en phase liquide. Les protéines de différents poids moléculaires ont été récupérées et analysées par chromatographie en phase liquide avec ionisation par electrospray couplé au spectre de masse (LC-nano ESI-MS/MS) par le Centre Commun de Microséquencage des Proteines (CCMP, IFR 128, IBCP, Lyon). Les résultats d'identification des protéines des vésicules de pétales de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 15).

Tableau 15 : résultats des protéines séquencées. X : protéine trouvée une seule fois dans les deux protéomes. XX : protéine trouvée dans les deux protéomes réalisés. Le score généré par l'algorithme Paragon du logiciel Protein Pilot permet de hiérarchiser les résultats obtenus en fonction de la précision de mesure, du nombre de peptides matchés et la couverture de séquences. Un score de 2 correspond à 99 % de certitude. VL : vésicules lipidiques animales ou fongiques.

Noms de protéines	Répétition	Score	Groupes fonctionnels	Localisation dans des vésicules
Lipoxygénase	X	2,5	Synthèse du parfum	Oléosomes
O-méthyltransférase	XX	9		
Caroténoïde dioxygénase	XX	14		Plastoglobules
HSP70	XX	10	Stress	VL
HSC70	XX	9,43		VL
HSP90	XX	4		VL
BiP	XX	6,4		VL
HSP81	XX	4		
HSP101	X	3,2		
2-cysteine peroxyredoxine	X	3,2		
Protéine 14-3-3	XX	3		
Superoxide dismutase	X	8		
GRP ARN	X	15,1	Stress/synthèse des protéines	
Ubiquitine	XX	4,4	Stress/protéasome/protéolyse	
Polyubiquitine	X	5,25		
26S protéase	X	6	Stress/protéasome	
CDC48	X	3,2		
Chaperone DnaK	X	5,6	Stress/protéolyse	
Chaperone Clp	X	6,4		
Complexe protéase Clp	X	3,3		
Fibrillines	XX	4	Protéine de structure	Plastoglobules
Tubuline	XX	4		VL
Actine	XX	8,7		VL
H ⁺ -ATPase membrane plasmique	X	10	Pompe à proton	Oléosomes
Facteur de ribosylation ADP (=ARF)	X	6,4	Transduction du signal	VL
Catalase	X	2	Photosynthèse	VL
Phospholipase D	X	7	Métabolisme des lipides	VL
Isocitrate déshydrogénase	X	4	Cycle de Krebs	
Malate déshydrogénase	XX	5		
Aconitase	X	4		
GAPDH	XX	16	Glycolyse	
3-phosphoglycerate kinase	XX	2,48		
Pyruvate kinase	X	4		
Fructose bisphosphate aldolase	XX	9		
Phosphoglucose isomérase	X	2,3		
Enolase	XX	13		
IPGAM	X	3,5		
PEP carboxylase	XX	5	Divers métabolismes	

Noms de protéines	Répétition	Score	Groupes fonctionnels	Localisation dans des vésicules
Pyruvate décarboxylase	X	4		
6-phosphogluconate déshydrogénase	XX	3	Voie des pentoses phosphate	
Transcétolase	X	8		
Serine hydroxyméthyltransferase	X	6		
Aspartate kinase II / complexe homoserine déshydrogénase	X	3,2	Métabolisme des acides aminés	
IPGAM	X	3,5		
Adénosylhomocystéinase	XX	12		
S-adénosylméthionine synthétase	XX	7,1		
Met synthase VitB12 independent	XX	10		
Ribosome 40S	XX	8,4	Synthèse protéique	
Ribosome 60S	X	9,6		
Facteur d'initiation de traduction	X	7,2		
Facteur d'élongation	XX	7		
Cyclophiline	XX	2		
Phosphoglucomutase	XX	6	Métabolisme des sucres et de l'amidon	
UDP-glucose déshydrogénase	X	4,4		
Invertase	XX	2		
α -xylosidase	X	2,3		
UDP-glucose pyrophosphorylase	X	13		
Saccharose synthase	XX	3,5		

Les protéines identifiées sont réparties par groupes fonctionnels incluant notamment les protéines impliquées dans le métabolisme primaire, dans la voie de biosynthèse des parfums, dans le stress et dans le protéasome. Il est à noter que certaines protéines sont communes à deux groupes de fonctions différents.

Les protéines du métabolisme primaire comprennent les protéines du cycle de Krebs, de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate, du métabolisme des acides aminés, de la synthèse protéique et du métabolisme des sucres et de l'amidon. Elles ont été trouvées en grand nombre (46 %). Beaucoup de ces protéines sont cytosoliques et proviennent vraisemblablement d'une contamination lors de la préparation des vésicules lipidiques ; leur présence n'a jamais été démontrée dans les oléosomes. Par exemple, la D-fructose-1,6-biphosphate aldolase, des invertases et des saccharoses synthases ont été identifiées dans notre protéome. Dans d'autres travaux, la D-fructose-1,6-biphosphate aldolase, isolée de l'épinard, du pois, du blé et de la fraise, a été observée dans deux compartiments cellulaires, le cytosol et les chloroplastes (Lebherz et al., 1984 ; Anderson et Pacold 1972 ; Gasperini et Pupillo ; 1983 ; Schwab et al., 2001), jamais dans des oléosomes. La même recherche bibliographique peut-être faite pour les invertases. Elles interviennent dans le métabolisme des sucres pour

hydrolyser le saccharose en glucose et fructose. Chez les plantes, il existe trois types d'invertases : deux fonctionnent à pH acide (≈ 5) et sont localisées dans la vacuole et la paroi, la troisième fonctionne à pH alcalin ($\approx 7,5$) et est localisée dans le cytosol. Cependant les invertases ne sont pas les seules enzymes à dégrader le saccharose. La saccharose synthase, soluble ou membranaire, hydrolyse le saccharose en fructose et UDP-glucose de façon réversible (Roistch et González, 2004). Chez les plantes, l'ensemble des réactions enzymatiques de la glycolyse se déroule à la fois dans le cytoplasme et dans les plastes (Plaxton, 1996). Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est une enzyme cytosolique et plastidiale qui convertit de façon réversible la glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-biphosphoglycérate. Elle joue un rôle également dans la gluconéogenèse (Plaxton, 1996). Chez les plantes, le glucose et le fructose sont rapidement phosphorylés en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate pour rentrer dans la glycolyse et dans la voie des pentoses phosphates. Cette dernière a lieu dans le cytosol. Elle est principalement responsable de la synthèse de NADPH à partir de NADP⁺. Elle démarre avec l'oxydation du glucose-6-phosphate pour produire du ribulose-5-P. C'est la seule voie de dégradation des hexoses qui permet la réduction du NADP⁺. Elle produit également l'érythrose-4-phosphate qui est utilisé dans la voie de l'acide shikimique, le ribulose-5-phosphate pour la synthèse de l'isopentényl pyrophosphate (IPP) et des composés de la paroi cellulaire et le ribose-5-phosphate, précurseur des nucléotides (Taiz et Zeiger, 1998; Bramley, 1997). Le cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques, responsable de la dégradation du pyruvate, se déroule dans la matrice ou au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Par exemple, l'isocitrate déshydrogénase est localisée dans la matrice mitochondriale (Galvez et al., 1998). Comme on le voit, pas une seule de ces voies métaboliques et pas une des enzymes liées à ces voies n'a jamais été localisée dans des oléosomes. De plus, il n'existe aucune hypothèse bibliographique permettant de supposer que des étapes de la glycolyse, de la gluconéogenèse ou des voies que nous venons de décrire se déroulent sur ou dans les oléosomes. La conclusion est donc qu'il s'agit de protéines contaminantes.

Treize % des protéines de nos protéomes ont déjà été localisées dans les corps lipidiques des animaux ou des levures. Parmi ces protéines, certaines sont des protéines de structures comme la tubuline et l'actine, d'autres sont des protéines liées au stress, notamment HSP70 et la BiP qui sont des chaperonnes. Des pompes H⁺-ATPase de la membrane plasmique ont déjà été identifiées dans les vésicules lipidiques des pétales d'œillet (Hudak et Thompson, 2000). L'ARF ou « ADP ribosylation factor », protéine faisant partie de la famille des protéines G,

est commune à notre protéome et à celui des animaux. En effet, chez les souris, l'ARF-GFP a été détecté en microscopie confocale à la surface des corps lipidiques. Pour confirmer cette présence dans ce compartiment, une colocalisation entre l'ARF et la protéine marqueur des adipocytes a été mise en évidence (Nakamura et al., 2005). La catalase a également été identifiée et elle est retrouvée dans les corps lipidiques des levures. Elle a un rôle de catalyser la dismutation de l'eau oxygénée (Veenhuis et al., 1989). La phospholipase D dans les vésicules lipidiques des pétales de rose est commune à celle des animaux. Chez la souris, en « Western-blot », la phospholipase D a été mise en évidence dans la fraction vésiculaire. Sa localisation a été confirmée en microscopie confocale (Nakamura et al., 2005).

Deux % des protéines sont liées au COV dont trois enzymes des voies de biosynthèse du parfum retrouvées dans ces deux protéomes. La caroténoïde dioxygénase produisant de la β -ionone a déjà été montrée dans les plastoglobules (Rubio et al., 2008), la lipoxygénase donnant des dérivés des acides gras odorants, déjà observée, en microscopie, dans les oléosomes (Radetzky et al., 1993) et l'O-méthyltransférase, la présence de cette dernière n'ayant jamais été démontrée dans les corps lipidiques (Scalliet et al., 2006).

Une autre protéine très intéressante, la fibrilline, a été mise en évidence et marque spécifiquement les plastoglobules. Cependant, la protéine marqueur des oléosomes, l'oléosine, n'est pas été trouvée dans ces deux protéomes.

En conclusion, l'analyse protéomique a montré que la fraction lipidique vésiculaire des pétales de rose contient des protéines déjà observées dans d'autres protéomes de vésicules lipidiques (vésicules lipidiques animales ou fongiques, oléosomes et plastoglobules). Certaines de ces protéines ont été localisées par GFP ou immunocytochimie sur des vésicules lipidiques (Tableau 15). Celles qui nous intéressent le plus sont bien sûr les enzymes de biosynthèse de COV. Cependant, concernant les protéines marqueurs de cet organite, seule la fibrilline strictement associée aux plastoglobules a pu être identifiée.

B. Expression d'une oléosine exogène

L'oléosine est un marqueur des oléosomes des graines et du tapetum chez toutes les espèces végétales étudiées. De par sa structure, cette protéine se replie au travers des membranes phospholipidiques à simple feuillet entourant les oléosomes. Afin de démontrer l'existence d'une telle membrane dans les vésicules lipidiques des pétales de rose, un protocole

d'expression transitoire avec une oléosine fusionnée à la GFP a été mis au point. En effet, il est possible de faire exprimer à des cellules de façon transitoire, des gènes grâce à des techniques d'infiltration d'une souche d'*A. tumefaciens* renfermant le plasmide dans lequel le gène d'intérêt est fusionné à la GFP. Cette technique est utilisée en routine pour un grand nombre d'études de localisation subcellulaire, par exemple chez le tabac (Batoko et al., 2000). Ce dernier travail a servi de base pour mettre au point la technique d'expression transitoire dans les pétales de roses in planta (Figure 25).

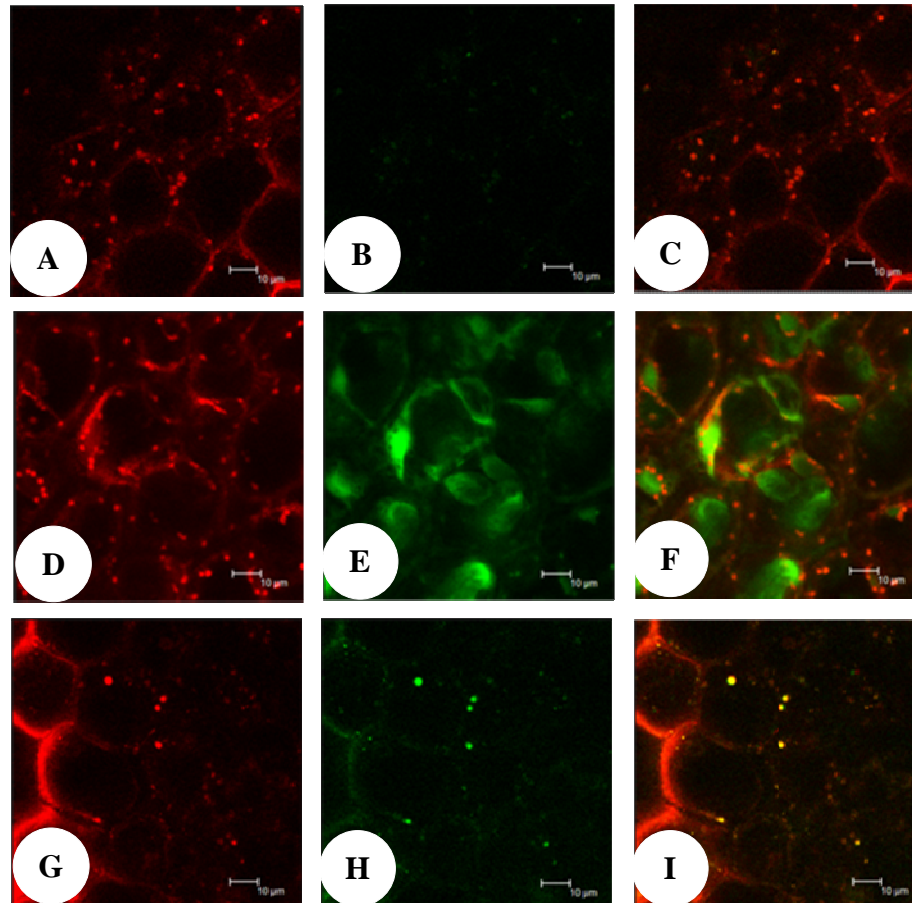


Figure 25 : localisation cellulaire de l'oléosine dans les cellules épidermiques de pétales de roses en microscopie confocale. A-D-G) La première colonne correspond aux pétales colorés au Nile Red. B) pas de construction GFP (contrôle). E) Expression transitoire de la construction témoin *35S::GFP* dans des cellules de pétales de rose. H) Expression transitoire de la construction *35S::oléosine-GFP*. C-F-I) Double marquage Nile Red et GFP. C) Superposition de A et de B. F) Superposition Nile Red et *35S::GFP*. I) Superposition Nile Red et *35S::oléosine-GFP*. Les barres d'échelle représentent une échelle de 10 µm.

La coloration au Nile Red des pétales de rose a mis en évidence les vésicules lipidiques. Elles possèdent une taille d'environ 1 μm de diamètre et sont visibles chez tous les échantillons (transformés ou non). Les cellules qui ne sont pas transformées avec une construction GFP, présentent un léger marquage fluorescent qui est probablement dû aux anthocyanes et à la cuticule. Ce signal ne perturbe pas la suite des expériences. Lorsque la GFP n'est pas fusionnée à une séquence d'adressage, la fluorescence est localisée dans le cytoplasme. Le double marquage avec les vésicules colorées au Nile Red montre que les vésicules lipidiques sont à la périphérie des cellules, c'est-à-dire dans le cytoplasme. Dans le cas de la fusion en C-terminal d'une oléosine d'*A. thaliana* à la GFP, la fluorescence est restreinte à des vésicules d'environ 1 μm de diamètre. Le double marquage avec les vésicules colorées au Nile Red montre que l'oléosine colocalise avec les vésicules lipidiques. Les oléosines, protéines très hydrophobes constituées de soixante-douze acides aminés hydrophobes contigus, ont la particularité de s'enchasser dans des membranes lipidiques. Par exemple, chez l'arachide, en microscopie électronique, la membrane à simple feuillet phospholipidique a été mise en évidence (Yatsu et al., 1972) où des protéines telles que les oléosines y sont associées (Slack et al., 1980). Grâce à la mise au point de l'expression transitoire sur les pétales de rose, nous avons mis en évidence que les oléosines exogènes marquent les vésicules lipidiques. Il semblerait donc que les TG soient entourées d'une seule couche de phospholipides. Ces deux caractéristiques nous permettent d'étayer la théorie selon laquelle les vésicules lipidiques purifiées de pétales de roses sont des oléosomes.

III. Recherche de COV dans les vésicules de pétales de rose.

Une fois qu'il a été démontré que les vésicules observées en microscopie pouvaient correspondre à des oléosomes de pétale, une recherche des COV dans la fraction lipidique de roses plus ou moins parfumées a été entreprise. Deux types d'expériences ont été retenus : une comparaison des fractions vésiculaires dans des variétés non parfumées et parfumées et une analyse des COV par CPG-SM dans la fraction lipidique de variétés à odeurs très différentes.

A. Recherche d'oléosomes dans des roses non parfumées

Certaines roses, notamment celles cultivées pour les fleurs coupées, sont quasiment dépourvues de parfum (Gudin, 1995). Nous souhaitons savoir si les roses non parfumées contiennent des vésicules lipidiques ou si elles en sont dépourvues. Cette expérience nous permettrait de montrer le rôle des vésicules lipidiques dans le stockage des parfums. Pour cela, la mise en évidence de vésicules dans les roses non parfumées avec le protocole d'extraction doit être effectuée sur des roses ne produisant pas de COV. Ainsi, une vérification de l'absence de COV a été réalisée par CPG-MS sur les pétales des quatre variétés 'Duett', 'Akito', 'Rose de la Belle' et 'Sonrisa' qui sont commercialisées sur le marché des roses coupées. Elles sont considérées comme pratiquement inodores. Les résultats obtenus sont présentés dans Tableau 16.

Tableau 16 : composés organiques volatils extraits des pétales des variétés de roses non parfumées 'Duett', 'Akito', 'Rose de la Belle', 'Sonrisa' et de la variété parfumée *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' au stade FE. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre/g_{PF}.

Composés	The Mac Cartney Rose	Duett	Akito	Rose de la Belle	Sonrisa
Dérivés d'acides gras odorants	11000,0	0,4	3,6	2,3	1,2
Composés aromatiques	290100,0	0,0	0,0	1,0.	3,2
Terpènes et leurs dérivés	110800,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Composés totaux	486600,0	0,4	3,6	3,3	4,4

Une étude comparative de COV est réalisée avec une rose parfumée *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' (Tableau 16). Les quantités de COV totaux extraites des quatre variétés de roses non parfumées sont beaucoup plus faibles que celles extraites chez la variété parfumée, au même stade de développement. Ainsi, au stade FE, les pétales de la variété *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' renferment $486,6 \cdot 10^3$ ng équivalent camphre/g_{PF} de COV contre 3,3 ng équivalent camphre/g_{PF} pour 'Rose de la Belle'. Pour ces quatre variétés de rose non-parfumées, une classe de composés est représentée majoritairement : les dérivés d'acides gras odorants. Cependant, la quantité produite est très faible, comprises entre 0,4 et 3,6 ng équivalent camphre/g_{PF} pour les quatre variétés de roses, alors que la valeur moyenne pour la rose parfumée de référence est de 11,0 µg équivalent camphre/g_{PF}. Les acides gras odorants

confèrent un parfum dit " de note verte ", ayant l'odeur d'herbe coupée, ils sont d'ailleurs obtenus par blessure. De plus, pour 'Rose de la Belle' et 'Sonrisa', une très faible quantité de DMT, respectivement 1,0 et 3,2 ng équivalent camphre/g_{PF}, a été retrouvée donnant une faible odeur dite " de thé ". Cette expérience permet de confirmer que les variétés de roses choisies pour notre étude sont pratiquement dépourvues de parfums.

Trois tentatives de fractionnement cellulaires sont effectuées sur les quatre variétés de roses non parfumées. Dans l'ensemble du gradient de saccharose, aucune vésicule lipidique n'est observée (Figure 26A).

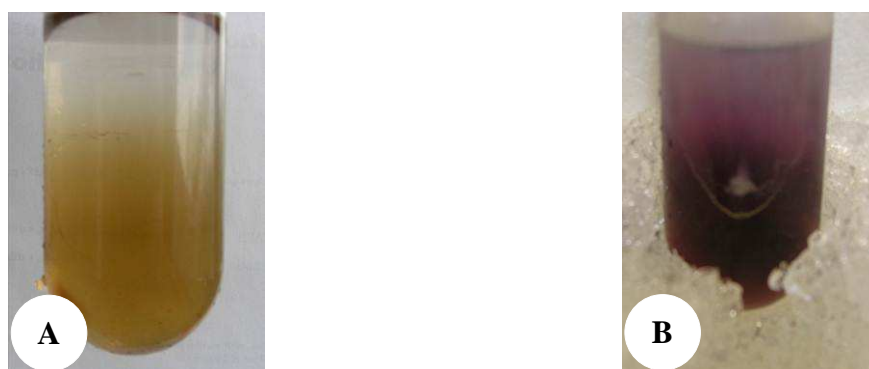


Figure 26 : A) absence de vésicules après extraction sur gradient de saccharose. B) Présence de vésicules lipidiques chez une rose parfumée.

En conclusion, les quatre variétés de roses non parfumées sont capables de synthétiser des quantités négligeables de certains COV, notamment les dérivés d'acides gras. Aucune vésicule lipidique n'est pourtant mise en évidence par la technique d'extraction par flottaison.

B. Recherche de COV dans les oléosomes de pétales de roses parfumées

Afin de confirmer la production et/ou le stockage des COV dans les vésicules de pétales de roses parfumées, les vésicules sont extraites de la même façon que précédemment. La composition en COV extraits des vésicules de pétales est comparée à celle des pétales de roses.

1. Analyse des COV dans les pétales de roses parfumées

Afin de connaître la composition et la quantité totale en COV renfermées dans les pétales, une analyse est réalisée avec quatre variétés de roses hybrides parfumées 'The Mac Cartney

Rose', 'Caprice de Meilland', 'Line Renaud' et 'Grégory Lemarchal', prélevées au stade FE. Pour cela, 0,5 g de pétales ont été mélangés à 2 mL d'hexane. L'extrait a été récupéré et analysé en CPG-SM. Le tableau représente les résultats obtenus (Tableau 17).

Tableau 17 : composés volatils majeurs identifiés par extraction dans les pétales au stade FE des variétés de roses hybrides 'The Mac Cartney Rose', 'Caprice de Meilland', 'Line Renaud', 'Gregory Lemarchal'. La quantité est exprimée en ng équivalent camphre/g_{PF}.

Composés	The Mac Cartney Rose	Caprice de Meilland	Line Renaud	Grégory Lemarchal
Hexanal	2,4.10 ³	6,0.10 ³	3,5.10 ³	2,4.10 ³
E-2-hexénal	5,1.10 ³	24,4.10 ³	6,0.10 ³	9,1.10 ³
Hexyl acétate	3,6.10 ³	1,4.10 ³	2,7.10 ³	0,7.10 ³
Z-3-hexényl acétate	0,0	3,8.10 ³	1,2.10 ³	4,1.10 ³
E-2-hexényl acétate	0,0	0,6	0,7.10 ³	0,0
β-caryophyllène	0,0	0,0	0,0	3,5.10 ³
β-élémane	0,0	0,0	0,0	1,5.10 ³
Phénylacétaldéhyde	5,7.10 ³	0,0	3,3.10 ³	3,3.10 ³
Citronellyl acétate	0,0	2,0	0,9.10 ³	0,0
Néral	4,2.10 ³	8,2.10 ³	29,2.10 ³	0,0
Germacrène D	50,0.10 ³	1,9.10 ³	74,9.10 ³	45,4.10 ³
Géranial	17,5.10 ³	85,5.10 ³	39,2.10 ³	3,9.10 ³
δ-cadinène	7,3.10 ³	0,0	8,7.10 ³	2,4.10 ³
Néryl acétate	0,0	3,6.10 ³	0,0	0,0
Citronellol	43,3.10 ³	40,0.10 ³	19,7.10 ³	1,5.10 ³
Nérol	40,5.10 ³	71,3.10 ³	81,1.10 ³	1,1.10 ³
DMT	72,2.10 ³	46,3.10 ³	20,9.10 ³	4,9.10 ³
Géranol	22,8.10 ³	170,8.10 ³	38,1.10 ³	15,3.10 ³
2-phényléthanol	212,1.10 ³	2,2.10 ³	169,7.10 ³	295,5.10 ³
Farnésol	0,0	28,8.10 ³	12,7.10 ³	27,7.10 ³
Composés totaux	486,6.10 ³	496,9.10 ³	512,5.10 ³	422,3.10 ³

Dans ces quatre variétés de rose, toutes les classes de COV sont représentées (dérivés d'acides gras, terpènes et composés aromatiques) avec une majorité de terpènes. Pour les variétés 'Line Renaud' et 'Caprice de Meilland', ils représentent respectivement 59 % et 83 % des composés totaux. Pour *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' et *R. x hybrida* 'Grégory Lemarchal', ces composés représentent un pourcentage moins important : respectivement 38 % et 24 %. Outre les terpènes, les composés aromatiques sont également des composés majeurs du parfum. Pour *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose', *R. x hybrida* 'Caprice de Meilland' et *R. x hybrida* 'Line Renaud', ils représentent respectivement de 60 %, 10 % et 38 %. Le 2-phényléthanol est le composé majeur de la variété 'Grégory Lemarchal' puisqu'il représente 70 % des composés totaux. Par contre *R. x hybrida* 'Caprice de Meilland' produit très peu de 2-phényléthanol (< 1 %). D'autres composés, comme les dérivés d'acide gras, représentent

une part importante des composés extraits des pétales. Ces composés sont l'hexanal, E-2-hexénal, hexyl acétate, Z-3-hexényl acétate et E-2-hexényl acétate. Ils sont produits en plus faible quantité, de 2 % à 7 %, pour les quatre variétés. Cette étude a permis d'élaborer la composition de COV pour chaque variété de roses parfumées.

2. Analyse des COV dans les vésicules lipidiques de roses parfumées

Afin de montrer que les COV restent confinés à l'intérieur des vésicules, une étude préliminaire a été réalisée sur un mélange d'étalons de quatre COV : le germacrène D, le DMT, le géraniol et le 2-phényléthanol. Ce sont, en général, les COV les plus abondants en quantité dans les pétales de roses parfumées. Les quatre COV de quantités différentes ont été mélangés à une solution de 0,8 M de saccharose surmontée par une solution de 0,4 M de saccharose. Après 3 heures de centrifugation, les fractions 0,8 M et 0,4 M ont été prélevées, mélangées volume à volume avec de l'hexane et analysées en CPG-SM (Tableau 18).

Tableau 18 : composés organiques volatils identifiés dans le gradient de saccharose. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre.

COV	Mélange initial	Fraction 0,8M	Fraction 0,4M
Germacrène D	2,3	1,1	1,2
3-5 diméthoxytoluène	1,7	1,7	0
Géraniol	15	15,1	0
2-phényléthanol	12,8	12,8	0

Toutes les quantités de DMT, géraniol et 2-phényléthanol déposées sont retrouvées dans la fraction 0,8 M. Par contre, la moitié de la quantité totale de germacrène D est située dans la fraction 0,4 M ; ce qui semble indiquer que lors de la centrifugation, ce COV migre dans le gradient de saccharose. La conclusion est que les COV ne semblent globalement pas migrer dans le tampon 0,4 M.

L'étude du stockage des COV dans les vésicules a ensuite été réalisée sur la fraction vésiculaire des pétales. Les expériences sont répétées trois fois et sur quatre variétés de roses. Les COV ont été extraits de la fraction vésiculaire dans un volume d'hexane et analysés en CPG-SM. Au cas où les vésicules ne soient pas intactes et laissent échapper des COV lors de la préparation, le reste du gradient 0,4M a été également analysé. Les résultats semblant peu reproductibles, un test du χ^2 d'homogénéité a été réalisé (Tableau 19).

Tableau 19 : COV identifiés dans les vésicules de pétales et dans la fraction 0,4 M pour les quatre variétés de roses hybrides parfumées 'The Mac Cartney Rose', 'Caprice de Meilland', 'Line Renaud' et 'Grégory Lemarchal'. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre/g_{PF}. Un test de χ^2 est réalisé pour les trois répétitions de chaque variété de roses parfumées. La valeur critique du tableau de χ^2 est comparée avec la valeur calculée (valeur calculée > ou < à la valeur critique). - correspond aux COV non détectés dans la fraction.

	The Mac Cartney Rose						Caprice de Meilland						Line Renaud						Grégory Lemarchal					
	ng/g _{PF}						ng/g _{PF}						ng/g _{PF}						ng/g _{PF}					
	Fract 0,4 M			Vésicules			Fract 0,4 M			Vésicules			Fract 0,4 M			Vésicules			Fract 0,4 M			Vésicules		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
2-phényléthanol	10 ⁻³	24,5	33,5	3,8	1,3	2,1	-	-	-	-	-	-	525,7	10 ⁻³	13,2	6,5	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	4,8	8,6	6,3
β -citronellol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronellol	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	2,3	1,6	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMT	10 ⁻³	25,4	34,7	1,3	1,4	0,4	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	3,6	2,3	3,3	10 ⁻³	10 ⁻³	1,9	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
E-2-hexényl acétate	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Géranial	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	1,8	2,6	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Géranol	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	2,2	0,3	0,2	10 ⁻³	162,1	100,3	14,9	12,5	9,0	151,9	10 ⁻³	7,1	7,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexanal	10 ⁻³	11,6	9,7	0,2	0,4	0,1	10 ⁻³	10 ⁻³	6,7	0,1	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z-3-hexén-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexyl acétate	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Néral	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	1,1	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nérol	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	1,5	0,7	0,1	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	7,4	4,3	3,7	133,8	10 ⁻³	7,5	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-
E-2-hexénal	10 ⁻³	16,2	13,8	0,6	0,8	0,4	10 ⁻³	68,5	58,6	3,1	3,2	3,0	80,1	10 ⁻³	2,3	2,8	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	0,7	1,0	0,9	-
Z-3-hexényl acétate	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	-	0,3	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test χ^2	2,49 < 7,82			54,81 > 18,31			5,25 < 5,99			10,99 < 28,87			100 > 7,82			9,58 < 11			0,16 < 5,99					

D'après ce test, les mesures suivent la même distribution sauf pour la fraction de vésicules de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' et la fraction « tampon 0,4M » de *R. x hybrida* 'Line Renaud'. Il est donc possible de faire les moyennes sur les résultats obtenus avec *R. x hybrida* 'Grégory Lemarchal' et 'Caprice de Meilland' (Figure 27).

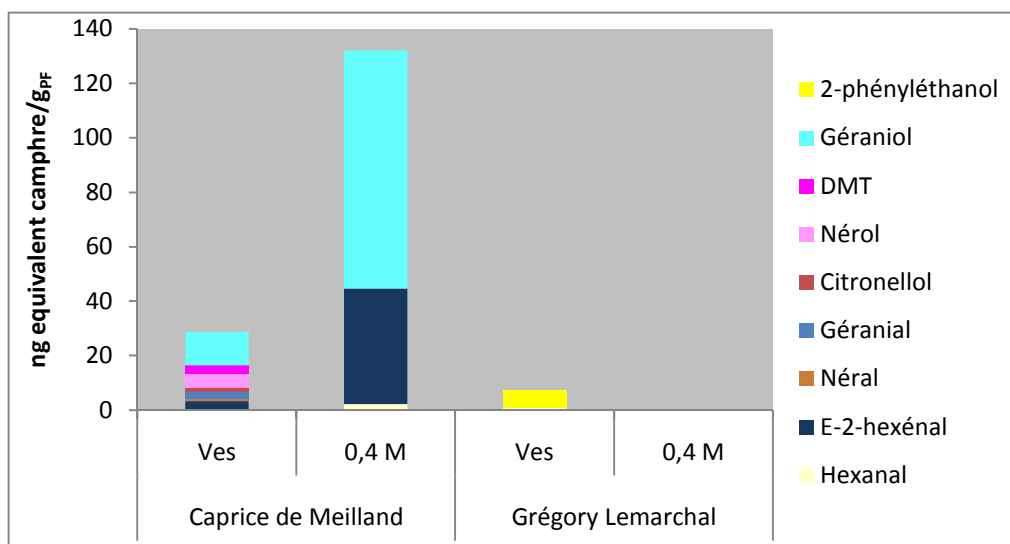


Figure 27 : composés organiques volatils majeurs extraits des vésicules et de la fraction 0,4 M des pétales de roses hybrides parfumées 'Caprice de Meilland' et 'Gregory Lemarchal' au stade FE. Les quantités sont exprimées en ng équivalent camphre/g_{PF}.

Pour les deux variétés de roses parfumées, la fraction vésiculaire représente une faible quantité de COV, inférieure à 25 ng équivalent camphre/g_{PF}. Dans cette fraction, les différentes classes de COV sont retrouvées, les acides gras, les terpènes et les composés aromatiques. La fraction 0,4 M montre une quantité de COV bien supérieure à celle des vésicules, sauf pour la variété 'Grégory Lemarchal' où la fraction 0,4 M ne contient pas de parfum.

La composition en COV contenue dans les vésicules isolées et celle des pétales de roses analysés en CPG est similaire et pour ces deux roses, les COV présent dans la fraction vésiculaire représentent ceux qui sont en plus grande quantité dans le pétale entier (Tableau 17). Le 2-phényléthanol est le composé majeur de la variété 'Grégory Lemarchal' puisqu'il représente 70 % des composés totaux et il est le plus abondant dans la fraction vésiculaire. Dans le pétale de 'Caprice de Meilland', le géraniol représente 35 % des COV totaux et la quantité de ce composé dans la fraction vésiculaire est la plus importante. Il est intéressant de noter que les différents COV présents dans les vésicules possèdent tous un caractère lipophile même si le 2-phényléthanol est le moins lipophile de tous (Tableau 6).

Une grande perte de parfum (facteur 1000) au moment de l'extraction des vésicules est observée (Tableau 19 et Figure 27). En effet, chez la variété 'Caprice de Meilland' 40 ng équivalent camphre/g_{PF} sont retrouvés après l'extraction vésiculaire contre $496,9 \cdot 10^3$ ng équivalent camphre/g_{PF} dans les pétales de roses.

En conclusion, il semble que la technique de fractionnement cellulaire conduise à une grande perte de COV. Beaucoup semblent se retrouver dans la fraction 0,4M. Les résultats obtenus ne permettent pas de valider l'hypothèse selon laquelle les vésicules produisent et/ou stockent les COV.

Caractérisation des oléosomes de pétales de rose par fractionnement cellulaire : conclusion et discussion

Ce travail de thèse porte sur le parfum des roses et sur la compréhension des mécanismes de production et d'émission des COV chez la rose. Cette problématique a été abordée à différents niveaux. Nous avons cherché à caractériser les vésicules observées dans des pétales de roses parfumées et également à montrer si ces vésicules sont impliquées dans le stockage des enzymes des voies de biosynthèse des COV ou des COV eux-mêmes. Dans cet objectif, nous avons travaillé sur les trois caractéristiques des oléosomes : contenu en TG, hémi-membrane et protéines de structure (oléosines). A la lumière des résultats obtenus, les points suivants peuvent être discutés.

I. Caractérisation de la fraction lipidique des pétales de rose

Afin de caractériser les vésicules extraites par la technique de flottaison, une coloration au Nile Red, marquant spécifiquement les TG a été utilisée. Cette coloration a aussi permis d'observer des vésicules lipidiques de tailles variant entre 0,6 et 1,3 μm . Ceci est en corrélation avec les vésicules lipidiques trouvées dans d'autres espèces telles que les oignons, les choux et les graines de coton puisqu'elles mesurent environ 1 μm de diamètre (Yatsu et al., 1971).

Pour démontrer que les vésicules des pétales de roses parfumées sont des oléosomes, leur composition lipidique a été d'abord étudiée. Les TG totaux extraits des vésicules de *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' sont les lipides principaux des vésicules. Ceci est en corrélation avec les vésicules extraites des pétales d'œillets, *Dianthus caryophyllus*, où la proportion de TG est très élevée puisqu'elle avoisine les 87 % des lipides totaux (Hudak et Thompson, 1996). Dans les graines, il est admis également que les oléosomes contiennent typiquement 92 à 98 % de TG (Huang, 1992). Notre étude de la composition en lipides des vésicules des pétales de roses a été affinée en estérifiant et méthylant les TG afin de connaître la composition en acides gras libres. Après analyse en CPG-SM, une haute proportion de C16,

C18, C18:1 et C18:2 a été retrouvée dans les vésicules de pétales de roses. Cette composition des vésicules en acides gras correspond à celle des oléosomes des cynorhodons de *R. canina*. Ceci est en corrélation avec la bibliographie. Par exemple, les huiles de tournesol contenant des oléosomes possèdent une haute proportion de C16, C18:1 et C18:2 (Dyer et al., 2008). Dans les vésicules lipidiques de pétales de *Dianthus caryophyllus*, les mêmes acides gras libres que ceux de notre étude sont retrouvés. Cependant, C18 :2 est en plus grande proportion puisqu'il représente 60 % des acides gras totaux (Hudak et Thompson, 1996). Dans le mésocarpe de l'olive, *Olea europaea*, les TG des oléosomes sont composés de 75 % de C18:1, 9 % de C18:2, 10 % de C16 et 6 % de C18:3 et C18.

En conclusion, cette étude a montré que les pétales de rose contiennent des vésicules lipidiques dont la composition est la même que celle des oléosomes des cynorhodons de rose. Cette composition est aussi typique des oléosomes des graines d'autres espèces.

II. Recherche de marqueurs d'oléosome dans les pétales

A. Identification de protéines d'oléosomes par protéomique

1. Problème des protéines non spécifiques dans le protéome

Parmi les protéines identifiées, 46 % sont des protéines du métabolisme primaire connues pour être localisées soit dans le cytosol soit dans d'autres organites que les oléosomes. C'est le cas de la GAPDH, de la D-fructose-1,6-biphosphate aldolase, des invertases et des saccharoses synthases par exemple. Il s'agit donc probablement de contaminations. Les techniques de fractionnement cellulaire amènent souvent à des contaminations d'autres organites. Chez les plantes, le noyau, les mitochondries et les plastes sont relativement faciles à obtenir en forme pure tandis que les organites endomembranaires sont difficiles à purifier sans des contaminations d'autres organites ayant la même densité (Wu et al., 2004 et Szponarski et al., 2004). Nos vésicules lipidiques d'environ 1 µm de diamètre doivent probablement présenter les mêmes types de problèmes. Afin de s'affranchir de ces contaminations, nous avons tenté en vain de purifier les vésicules en les lavant dans le tampon d'extraction et en réalisant une deuxième centrifugation sur gradient de saccharose. Après avoir extrait et mis en suspension les protéines, un gel d'électrophorèse en 1D de type SDS-

PAGE a été réalisé. Nous n'avons jamais obtenu suffisamment de protéines pour qu'elles soient séquencées. En fait, il est probable que ce type de démarche ne conduise qu'à éliminer une fraction de toutes les protéines, spécifiques et non spécifiques, et non à éliminer uniquement les protéines non spécifiques. D'après nos estimations, il aurait fallu plus de 5 kg de pétales pour réussir et nous ne disposons pas de telles quantités.

A l'opposé, la co-extraction des peroxysomes ne peut probablement pas être évitée car ceux-ci sont étroitement liés à l'utilisation des réserves lipidiques. Ils entrent en contact des oléosomes et hydrolysent les TG grâce à des lipases spécifiques. Lors de ce processus, ils forment des vésicules de 0,2 à 0,4 μm de diamètre collées aux oléosomes (Jedd et Chua, 2002). Nous avons ainsi obtenu par exemple une malate déshydrogénase. Cette enzyme possède un peptide signal de peroxysome et elle est retrouvée dans des protéomes de péroxysomes (Arai et al., 2008).

2. Identification de protéines marqueurs des différentes catégories de vésicules lipidiques

L'analyse de notre protéome a également montré la présence de protéines liées aux plastoglobules, aux oléosomes ou aux vésicules lipidiques animales ou fongiques.

Ainsi, l'analyse du protéome a montré la présence de fibrillines. Cette protéine est un constituant majeur des plastoglobules (Laizet et al., 2004), on ne la trouve que dans les plastoglobules. Dans la littérature, des plastoglobules ont déjà été repérés dans les pétales de rose. En effet, quand la fleur de la variété *R. x hybrida* 'Papa Meilland' est épanouie, les cellules de l'épiderme ont des plastes renfermant de nombreux plastoglobules (Bergougnoux et al., 2007). Notre fraction vésiculaire contient donc des plastoglobules.

A l'opposé nous n'avons pas trouvé de protéines marqueurs des oléosomes. Aucune oléosine, ni même de caléosine ou de stéroléosine n'a été identifiée. Ce résultat est à mettre en parallèle avec deux autres, non publiés, obtenus au laboratoire. Deux stagiaires de Master (M. Bouissière et S. Bonnard) ont aussi réalisé des extractions de vésicules de pétales et ont tenté de séquencer deux bandes protéiques majoritaires entre 10 et 35 kDa, elles n'ont jamais obtenu de marqueurs d'oléosomes. Enfin, S. Baudino, a tenté de cloner les gènes d'oléosines à partir d'ADN génomique et d'ADNc de pétales : des fragments d'oléosines proches des oléosines de graines ont été obtenus grâce à l'ADN génomique mais aucune bande d'oléosine n'a été détectée avec l'ADNc. Par ailleurs, dans la bibliographie, on trouve aussi quelques

résultats de ce type. Dans les vésicules lipidiques de pétales de *Dianthus caryophyllus*, une protéine de taille voisine à celle de l'oléosine, 17 KDa, a été trouvée. Cependant, l'emploi d'anticorps anti-oléosine en « Western-blot » n'a pas permis de détecter d'oléosine. Il est cependant important de noter que les anticorps anti-oléosine d'une espèce ne croisent pas avec ceux d'une autre espèce (Huang, 1992) car la partie N-terminale est très variable entre deux oléosines (Keddie et al., 1992).

Une hypothèse peut être avancée selon laquelle l'oléosine est une protéine très hydrophobe, ce qui pourrait expliquer l'absence de cette protéine dans notre protéome. Elle possède 72 acides aminés hydrophobes contigus dans la partie centrale, représentant quatre fois la taille d'un polypeptide transmembranaire habituel (Huang, 1996). Bien que le protocole utilisé permette de récupérer toutes les protéines hydrophobes et hydrophiles, il n'a peut être pas permis l'extraction de protéines très hydrophes. L'oléosine est très enchâssée dans la membrane et elle a un comportement particulier pour l'analyse en protéomique. En effet, en SDS-PAGE, la protéine fortement insoluble ne migre pas ou alors elle n'est pas accessible à la coupure à la trypsine. Si cette protéine est chargée négativement, elle n'est peut être pas ionisée et donc ne sera pas identifiée en LC-MS-MS. Il faut cependant noter qu'avec des protocoles similaires il est possible d'obtenir des séquences d'oléosine dans des protéomes d'oléosomes de graines (Jolivet et al., 2004 ; Katavic et al., 2006). Une autre hypothèse doit donc être trouvée. Elle pourrait être extraite mais comme la partie N-terminale est très variable, le peptide de l'oléosine pourrait ne pas correspondre avec la banque de données d'*A. thaliana*, la banque de données de la rose n'étant pas encore disponible à ce jour. Enfin, il est possible d'envisager que les oléosomes de pétales n'ont pas ce type de protéines. C'est aussi le cas des vésicules lipidiques de levure et des oléosomes de fruits. Aisni, le mésocarpe de l'avocat et de l'olive possède des oléosomes dépourvus d'oléosine, mais ces oléosomes sont de taille plus importante, d'un diamètre de l'ordre de 20 µm (Ross et al., 1993), ce qui ne correspond pas à la taille de ceux que nous avons observés. La question reste donc ouverte.

3. Identification d'autres protéines liées aux vésicules lipidiques

Dans le protéome de la fraction vésiculaire, plusieurs séquences correspondent à des protéines pour lesquelles des travaux de localisation subcellulaire (fusion à la GFP ou immunocytochimie) ont déjà été réalisés. Ces protéines ne sont pas des marqueurs car elles ne restent pas en permanence sur les vésicules lipidiques. C'est le cas des protéines liées au

stress, telles que la BiP et différentes HSP par exemple (Haas et al., 1994 ; Prattes et al., 2000 ; Brasaemle et al., 2004 ; Wan et al., 2007 ; Jiang et al., 2007). Ce type de localisation temporaire sur les vésicules lipidiques est à l'origine de la théorie des « protéines réfugiées » ou « protéines recrutées » (Welte et al., 2007 ; Goodman et al., 2008). Dans cette théorie, non strictement démontrée, les vésicules lipidiques seraient un site de séquestration pour certaines protéines, soit pour les inactiver, soit pour éviter des agrégats protéiques qui causeraient des dommages cellulaires. Parmi ces protéines l'HSP 70 replierait les protéines dénaturées qui seraient accumulées à la surface des vésicules et seraient ainsi stockées sous forme repliée (Jiang et al., 2007).

La tubuline et l'actine ont aussi été mises en évidence dans les oléosomes. Ce sont des protéines du cytosquelette qui jouent un rôle important dans le maintien de la forme, la mobilité et l'adhésion des cellules. En immunoblot, la présence de la β -actine à la périphérie des gouttelettes lipidiques de cellules de la médullosurrénale et d'adipocytes de rat a été démontrée (Fong et al., 2001). Une étude protéomique des adipocytes des animaux a permis de révéler la tubuline dans les vésicules lipidiques. Lors de la lipolyse, l'association tubuline et les vésicules lipidiques pourraient être importantes pour faciliter la fragmentation des vésicules (Brasaemle et al., 2004). Le rôle de ces protéines dans le transport intracellulaire des globules lipidiques est mal connu aujourd'hui (Fong et al., 2001).

Parmi les protéines obtenues, 10 % des protéines sont des protéines du protéasome et de la protéolyse. Un exemple dans la bibliographie pourrait expliquer la présence de ces protéines dans notre fraction vésiculaire. Dans les travaux d'Ohsaki en 2006, le rôle fonctionnel des vésicules lipidiques dans l'assemblage des lipoprotéines à faible densité a été étudié chez les animaux, notamment dans les hépatocytes. Il a été montré que les apolipoprotéines B ubiquitinilés adhèrent aux vésicules lipidiques. En microscopie électronique, ces corps lipidiques stockant à leur surface ces protéines avoisinent le protéasome afin que celles-ci soient dégradées (Ohsaki et al., 2006). Pour mettre en évidence les interactions entre les vésicules lipidiques entourées d'apolipoprotéines B et le protéasome, un inhibiteur du protéasome a été utilisé ; ceci engendrant une forte accumulation des apolipoprotéine B autour des vésicules lipidiques. Pour confirmer l'association des composants du protéasome et des protéines ubiquitinilées avec les vésicules lipidiques, un « Western blot » a été réalisé sur la fraction vésiculaire ; les apolipoprotéine B, leur forme ubiquitinilée et la sous-unité 26S du protéasome ont été détectées. Ces vésicules lipidiques seraient donc un lieu de transport des

protéines ubiquitinilées et interagiraient ainsi avec le protéasome (Ohsaki et al., 2006). Cet exemple permet d'envisager que le protéasome soit aussi lié aux oléosomes chez les végétaux.

Une autre séquence protéique correspondant à des H⁺-ATPase de la membrane plasmique a été identifiée dans les vésicules lipidiques du protéome réalisé. Dans les travaux de Hudak et Thompson (2000), des pompes H⁺-ATPase plasmalemmiques ont été retrouvées dans les vésicules des pétales d'œillet. Les auteurs en déduisent que les vésicules pourraient ne pas être des oléosomes mais des vésicules de recyclage de la membrane plasmique. Cependant, ce type de microsome ne devrait pas flotter avec les lipides mais sédimenter. Une protéine 14-3-3 a aussi été identifiée dans notre protéome. Ce type de protéine intervient dans de nombreux phénomènes dont l'activation des domaines H⁺-ATPase de la membrane plasmique (Kanczewska et al., 2005). Cela semble donc confirmer qu'il existe un lien encore inconnu entre la membrane plasmique et la fraction lipidique vésiculaire : les oléosomes pourraient participer au transport ou au recyclage de certains éléments cellulaires.

4. Présence d'enzymes de biosynthèse des COV

Dans les deux protéomes réalisés pour notre étude, 2 % des protéines sont liées aux COV, dont une enzyme des voies de biosynthèse du parfum, la caroténoïde dioxygénase impliquée dans la biosynthèse de la β -ionone. Chez *Crocus sativus*, cette enzyme est localisée, en expression transitoire, dans les plastoglobules pendant le développement du stigmate (Rubio et al., 2008). Dans la bibliographie, d'autres enzymes de voie de biosynthèse des COV ont aussi été identifiées dans ce compartiment cellulaire. Dans les baies de la vigne, *Vitis vinifera*, des plastoglobules du péricarpe représenteraient un environnement adapté à l'accumulation des monoterpènes (Hardie et al., 1996). Dans cet article, une hypothèse est avancée selon laquelle ces plastoglobules auraient un rôle dans l'accumulation ou la séquestration des enzymes de voies de biosynthèse des COV ou des COV eux-mêmes. Enfin, chez *Vitis vinifera*, la valence synthase, enzyme produisant des sesquiterpènes volatils, notamment le valencène, a été localisée dans les oléosomes des microspores (Martin et al., 2009).

Dans notre étude, une autre enzyme des voies de biosynthèse du parfum, la lipoxygénase donnant des dérivés des acides gras odorants, a été mise en évidence. Dans les graines d'anis, cette enzyme a été localisée dans des oléosomes (Radetzky et al., 1993). Dans la bibliographie, d'autres enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras odorants ont été visualisées dans ce compartiment cellulaire. C'est le cas de l'hydropéroxyde lyase (Gardner, 1991). Par fusion avec la GFP et co-localisation avec une oléosine, il a été montré chez

Prunus sp. qu'elle était localisée dans les oléosomes des graines matures (Mita et al., 2005). Il a même été prouvé en immunolocalisation que, chez l'hépatique, *Marchantia polymorpha*, des corps lipidiques contiennent toutes les enzymes de voie de biosynthèse de monoterpènes telles que la géranylgéranyl diphosphate réductase et la phytoène synthase (Suire et al., 2000). Ainsi, certaines des enzymes de biosynthèse de notre protéome pourraient bien fonctionner au contact des oléosomes. Il n'est alors pas absurde de penser que les produits des réactions, c'est-à-dire des COV lipophiles, soient adsorbés par les oléosomes. Sachant que l'expression transitoire a été mise au point lors de ma thèse, il serait intéressant de confirmer la présence de la caroténoïde dioxygénase et de la lipoxygénase dans les vésicules lipidiques en microscopie confocale.

B. Expression d'une oléosine exogène : marqueur principal de l'hémi-membrane des oléosomes

Afin de démontrer que la membrane des vésicules est constituée d'un seul feuillet phospholipidique dans les pétales, une technique de transformation par infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens* a été mise au point au laboratoire et testée sur les pétales de roses entières. La construction utilisée est une C-terminale d'une oléosine d'*A. thaliana* à la GFP. Dans les cellules de l'épiderme supérieur, la fluorescence est restreinte à des vésicules d'environ 1 à 2 μm de diamètre. Le double marquage avec les vésicules colorées au Nile Red a montré que cette oléosine colocalise avec les vésicules lipidiques. Cette expérience permet d'affirmer que les vésicules possèderaient une monocouche de phospholipides car l'oléosine exogène, ayant une affinité pour ce type de membrane, s'insère. Cette technique est très utilisée pour localiser la présence de protéines dans les vésicules. Ces résultats concordent avec les observations effectuées chez des protoplastes de tabac infiltrés avec l'oléosine-GFP en expression transitoire. La fluorescence localisée dans les vésicules lipidiques a permis de confirmer la localisation de l'HPL dans ce compartiment (Mita et al., 2005).

En conclusion, nous pouvons donc affirmer que les vésicules lipidiques des pétales de rose ont la même composition en TG que des oléosomes, ont une hémi-membrane phospholipidique mais n'ont pas d'oléosine dans nos conditions d'extraction. Il s'agit donc soit d'oléosomes typiques soit d'oléosomes sans oléosine.

III. Recherche de COV dans les vésicules de pétales de rose

A. Recherche de vésicules contenant des COV dans les roses non parfumées

Dans cette partie, nous avons cherché à savoir si des oléosomes étaient présents chez des roses non parfumées. Cependant, les roses non parfumées pour le nez humain produisent souvent, et malgré tout, quelques COV. Effectivement, après vérification sur les variétés que nous avons utilisées ('Duett', 'Akito', 'Rose de la Belle', 'Sonrisa'), quelques COV (dérivés d'acides gras et DMT) ont pu être détectés mais en très faible quantité. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de Shalit et al. (2004) qui ont analysé une rose non parfumée 'Golden gate' et qui n'ont trouvé qu'un seul composé émis, le DMT.

Avec notre technique de fractionnement cellulaire, nous n'avons observé aucune fraction lipidique sur les quatre variétés de roses non parfumées. Une hypothèse peut donc être envisagée : sans COV, le nombre et/ou le volume des oléosomes du pétale diminuent. Pour confirmer ce résultat, une étude microscopique au Nile Red sur le pétale entier serait nécessaire.

B. Recherche de vésicules contenant des COV dans les roses parfumées

Dans les deux protéomes de notre étude, plusieurs enzymes de voie de biosynthèse du parfum ont été localisées dans les vésicules lipidiques. Cette localisation est tout à fait compatible avec un stockage ou un transport des COV par les oléosomes. Une étude des COV dans les oléosomes du pétale a donc été réalisée par la technique de flottaison afin de vérifier cette hypothèse. Pour les deux variétés de roses parfumées, la fraction vésiculaire représente une faible quantité de COV, inférieur à 25 ng équivalent camphre/g_{PF}. Après comparaison de la composition des COV contenus dans les vésicules isolées et celle des pétales de roses entiers, une grande perte de parfum (facteur 1000) au moment de l'extraction des vésicules a été observée. Ce résultat montre la difficulté de travailler sur les COV par fractionnement cellulaire et il est possible d'envisager soit que les COV sont cytosoliques et adsorbés par les TG au moment de l'extraction soit que les COV sont dans les oléosomes mais se dispersent dans le tampon lors du broyage.

L'adsorption des COV par les TG soulève le problème de leur solubilité lorsqu'ils sont déposés dans le gradient de saccharose. On peut émettre l'hypothèse que plus le COV est lipophile, plus il aurait d'affinité pour un compartiment cellulaire lipidique et donc tendance à diffuser à l'intérieur des vésicules. Les neuf composés présents dans les vésicules sont tous lipophiles, sachant que le 2-phényléthanol est le plus hydrosoluble de tous. Par contre, la réaction au NaDi est positive à la fois in situ et après extraction ainsi ces résultats nous permettraient d'éliminer l'hypothèse de l'adsorption des terpènes par les TG. Même s'il ne s'agit que d'une réaction histochimique, il semble donc que les terpènes soient localisés dans des vésicules des épidermes. Dans ces mêmes épidermes, nous avons démontré que cette réaction colocalise avec la coloration au Nile Red. Nous pouvons donc avancer l'hypothèse que les terpènes seraient soit stockés soit transportés par les oléosomes des épidermes du pétale.

La perte des COV semble donc être l'hypothèse la plus probable pour plusieurs raisons. Une force mécanique puissante est réalisée sur les pétales de rose afin de récupérer les vésicules lipidiques. Elles seraient alors cassées par le fait qu'il n'y aurait plus assez de phospholipides de surface pour les stabiliser. Les COV seraient libérés des vésicules dès la première étape du protocole. De plus, pour la migration des vésicules dans le gradient, une petite quantité de vésicules est diluée dans un milieu aqueux qui lui représente 50 mL et les COV présent dans les vésicules diffuseraient pour s'équilibrer avec le milieu aqueux, ce qui conduirait donc à la perte des COV dans les vésicules. Pour mettre en évidence cette hypothèse, des manipulations de marquage radioactif en utilisant un précurseur radioactif des COV seraient nécessaire. Au cours du temps, un dosage serait effectué dans les vésicules et dans le tampon 0,4 M ce qui permettrait d'évaluer la diffusion des COV. Néanmoins, il n'est pas sûr qu'une telle technique donne des résultats exploitables à cause de la vitesse de diffusion des COV dans le milieu et les difficultés inhérentes aux dosages radioactifs.

De plus, avec la technique de fractionnement cellulaire utilisée, la fraction vésiculaire récupérée ne représenteraient peut être pas la totalité des vésicules présentes dans les pétales frais. Il aurait été intéressant d'estimer le rendement d'extraction des vésicules. Cet argument permettrait d'expliquer la faible quantité de COV dans les vésicules et par conséquent la concentration de COV dans la fraction 0,4 M.

Une dernière hypothèse peut être avancée qui exclurait l'adsorption et la perte des COV. La différence de quantité de COV entre la fraction vésiculaire et la fraction 0,4 M représenterait une réalité biologique. Il existerait d'autres mécanismes de transport des COV que celui de la

sécrétion granulocrine et ces vésicules seraient soit l'un des nombreux sites de stockage des COV, soit seraient un compartiment de transport entre une zone de production et une zone de stockage.

La composition en COV des deux variétés de roses étudiées après fractionnement cellulaire a permis de montrer que seule la rose 'Grégory Lemarchal' possède du 2-phényléthanol dans les vésicules lipidiques alors que ce composé est présent dans les pétales de rose des deux variétés. L'absence de ce COV dans les vésicules de 'Caprice de Meilland' est peut être due à une grande perte de parfum (facteur 1000) au moment de l'extraction des vésicules et de plus ce composé est en très faible quantité dans les pétales entier ($2,2 \cdot 10^3$ ng équivalent camphre/gPF), ainsi sa détection n'a pas été possible dans ce compartiment cellulaire. Il serait intéressant de vérifier et confirmer la présence de ce 2-phényléthanol dans les vésicules lipidiques. Comme ces composés aromatiques ne peuvent pas être visualisés en microscopie car il n'existe pas de produits spécifiques permettant de les mettre en évidence, la technique de flottaison serait utilisée sur trois autres variétés de roses renfermant une grande quantité de 2-phényléthanol dans les pétales. Ainsi, on pourrait confirmer la présence ou l'absence de ce composé dans les vésicules lipidiques de rose.

Une perspective prometteuse pour la suite de ce travail est fournie par un article d'imagerie des huiles essentielles in situ (Strehle et al., 2005). Dans cet article, les auteurs localisent des phospholipides dans des vésicules de graine de fenouil (*Foeniculum sp.*). Ils localisent aussi de l'anethole (un phénylpropanoïde) dans d'autres vésicules. La technique utilisée est nommée « Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy ». Il s'agit d'une technique d'imagerie permettant d'augmenter et d'imager certaines longueurs d'ondes (dites Raman) émisent par une molécule frappée par des photons. Nous envisageons de colocaliser une molécule du parfum et les TG.

En conclusion de cette partie, l'étude des mécanismes d'émission du parfum des roses a été appréhendée par différentes techniques. Nous avons mis en évidence, dans les pétales de roses, des vésicules lipidiques s'apparentant à des oléosomes. Elles ont la caractéristique de posséder une matrice centrale où se concentrent les TG entourés vraisemblablement d'une membrane à un seul feuillet phospholipidique. Mais il semblerait qu'elles soient dépourvues d'oléosine. Ces oléosomes contiennent des enzymes de voies de biosynthèse. Grâce au protéome effectué sur les oléosomes, nous avons mis en évidence qu'ils renferment de nombreuses protéines notamment des protéines de stress, du protéasome ou encore des

protéines du cytosquelette. Des hypothèses sur le rôle des oléosomes peuvent être avancées selon lesquelles les vésicules seraient un site de séquestration pour certaines protéines soit dans le but de les inactiver soit pour éviter des agrégats protéiques qui causeraient des dommages cellulaires. Nous avons ensuite montré que les COV sont stockés dans les vésicules. Cependant ce point reste encore flou et d'autres études sont nécessaires pour pouvoir confirmer le rôle des vésicules dans le stockage des COV.

Etude de la biosynthèse du 2-phényléthanol par une approche génétique : résultats

I. Corrélation entre la production et l'émission du 2-phényléthanol

Dans cette partie, nous cherchons à étudier l'expression des allèles du gène *RhPAAS* (Kaminaga et al., 2006) dans une population issue d'un croisement entre une rose productrice de 2-phényléthanol, *R. wichuraiana*, et une rose très faiblement productrice, *R. x hybrida* 'H190'. Des résultats préliminaires ont en effet montré qu'il existait un QTL majeur expliquant la présence ou l'absence de 2-phényléthanol dans cette population HW et que le gène *RhPAAS* était situé à côté de ce QTL (Figure 5). Dans un premier temps, nous avons donc cherché à bien définir les stades de prélèvement et à bien connaître les variations en 2-phényléthanol. Dans un second temps, nous avons étudié l'expression des allèles a1, a2 et a3.

A. Choix de l'organe pour l'étude du 2-phényléthanol

Des études chez la rose sauvage *R. rugosa* (Dobson et al., 1999) et chez *R. x hybrida* 'Papa Meilland' (Bergounoux et al., 2007) montrent que tous les organes de la fleur produisent des COV, mais que la majorité de ces COV est produite par les pétales. Afin de vérifier que c'est bien le cas dans les roses de notre étude la répartition et la composition des COV dans les différents organes floraux ont été étudiés. Pour cela, une analyse en CPG-SM des COV a été réalisée trois fois par extraction à l'hexane sur les différents organes au stade FE : sépales, pétales et étamines. La Figure 28 présente les moyennes des quantités de COV pour chaque organe.

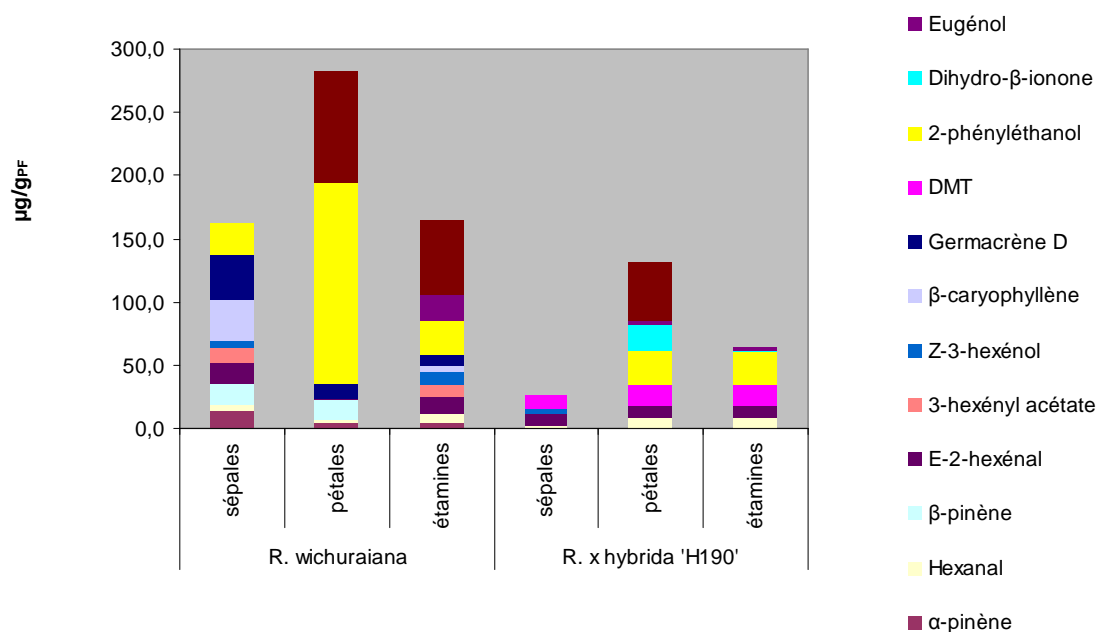


Figure 28 : composés organiques volatils majeurs identifiés par extraction dans les différents organes des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' au stade FE. La quantité de chaque COV est exprimée en µg/g_{PF}.

Ces résultats montrent que les quantités totales de COV pour les trois organes de *R. wichuraiana* (558 µg/g_{PF}) sont 2,5 fois plus importantes que celles de *R. x hybrida* 'H190' (223 µg/g_{PF}). Ils indiquent aussi, comme attendu, que le pétale est l'organe qui renferme le plus de COV devant les étamines puis les sépales. Les sépales et les étamines de *R. wichuraiana* possèdent des concentrations 1,5 fois moindre que les pétales. Une plus grande différence est observée pour *R. x hybrida* 'H190'. Les sépales et les étamines contiennent respectivement 4,9 et 2 fois moins de COV que les pétales.

Dans ces trois organes, les mêmes COV représentant toutes les classes de composés sont observées mais dans des proportions différentes : dérivés d'acides gras, terpènes et composés aromatiques. Par exemple, le E-2-hexénal est présent dans les trois organes mais en quantité 12,8 et 1,2 fois moindre dans les sépales que dans les pétales et les étamines, respectivement. Les acides gras odorants (E-2-hexénal, hexanal, 3-hexényl acétate, Z-3-hexénol) représentent 23 % dans les sépales de *R. wichuraiana* contre 1,7 % dans les pétales et 57 % dans les sépales de *R. x hybrida* 'H190' contre 28 % dans les étamines.

Les terpènes sont majoritaires puisqu'ils représentent respectivement 61 %, 46 % et 51 % des COV dans les sépales, étamines de *R. wichuraiana*, et pétales de *R. x hybrida* 'H190'. Dans

les trois organes de *R. wichuraiana*, le germacrène D est l'un des composés prédominant parmi les six terpènes identifiés : 5 % dans les pétales et les étamines et 21 % dans les sépales. En revanche, seuls deux terpènes sont quantifiés dans les pétales de *R. x hybrida* 'H190': la dihydro- β -ionone (16%) et le farnésol (35 %). Deux composés, α -pinène et β -pinène, sont absents dans les trois organes de la variété *R. x hybrida* 'H190'. Par contre ils représentent une quantité non négligeable (6 %) dans les trois organes de *R. wichuraiana*.

Outre les terpènes, les composés aromatiques sont également des composés majeurs du parfum. Parmi ces composés, le DMT, pour *R. x hybrida* 'H190', est le composé dominant parmi les composés aromatiques puisqu'il représente 43 % (sépales), 12 % (pétales) et 25 % (étamines) des composés aromatiques totaux. Le 2-phényléthanol, composé important dans notre étude, est prédominant chez *R. wichuraiana* puisqu'il représente 16 % des composés aromatiques dans les sépales et les étamines et 68 % dans les pétales. Pour *R. x hybrida* 'H190', le 2-phényléthanol est absent dans les sépales mais représente 21 % dans les pétales et 40 % dans les étamines.

Ainsi, les pétales sont bien la source majeure du parfum, notamment du 2-phényléthanol, chez ces deux variétés de roses. *R. wichuraiana* est une variété de roses qui produit beaucoup plus de parfums que *R. x hybrida* 'H190', autant en quantité qu'en diversité de COV. Cette expérience a permis de mieux connaître la composition et la répartition des COV à l'intérieur des différents organes. La suite de l'étude a donc porté sur les pétales au stade FE.

B. Choix du stade de développement pour l'étude du 2-phényléthanol

L'analyse des COV présents dans les pétales, au cours du développement floral, a été réalisée sur des variétés de roses très parfumées notamment *R. x hybrida* 'The Mac Cartney Rose' et *R. x hybrida* 'Papa Meilland' (Bergougnoux et al, 2007). Il a été montré sur ces variétés que les quantités de COV totaux augmentent au cours du développement de la fleur mais que chaque COV n'évolue pas de la même façon. Pour déterminer le stade de développement floral où la quantité de 2-phényléthanol est maximale, les COV ont été analysés aux quatre stades du développement des fleurs des deux parents : bouton juste ouvert (BJO), bouton ouvert (BO), fleur épanouie (FE), fleur sénescence (FS). L'analyse par extraction des COV présents dans les pétales a été réalisée trois fois. Les résultats sont présentés dans la Figure 29.

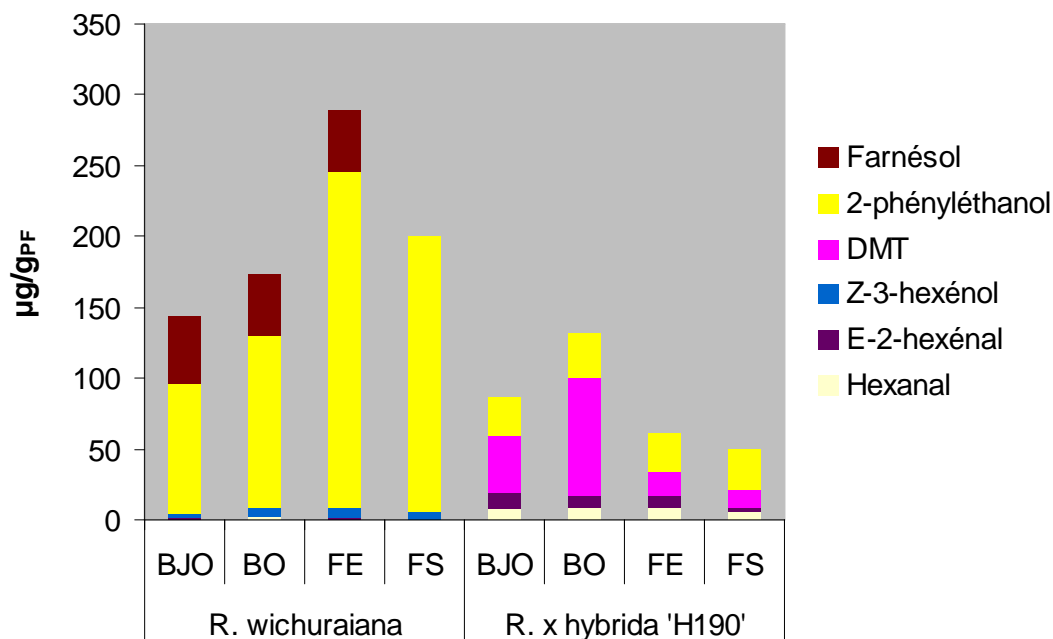


Figure 29 : COV majeurs extraits des pétales des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190'. Les quantités sont exprimées en µg/g_{PF}

Pour *R. wichuraiana*, les quantités totales de COV détectées augmentent au cours du développement de la fleur ; le maximum est détecté au stade FE, c'est-à-dire quand la fleur est pleinement ouverte. Pour *R. x hybrida* 'H190', la quantité totale de COV augmente dans les stades précoces (BJO et BO) et diminue aux stades plus tardifs (FE et FS). Les COV totaux produits, quel que soit le stade de développement de la rose, sont des dérivés des acides gras et des composés aromatiques. Ces derniers représentent, en fonction du stade de développement, de 63 à 97 % des COV totaux pour *R. wichuraiana* et de 76 à 81 % pour *R. x hybrida* 'H190'. La classe des acides gras est moins importante puisqu'elle représente, quel que soit le stade de développement, de 2 à 5 % des COV totaux pour *R. wichuraiana* et de 12 à 23 % pour *R. x hybrida* 'H190'. Cette expérience montre que les quantités les plus importantes de COV totaux sont produites aux stades BO pour *R. x hybrida* 'H190' et FE pour *R. wichuraiana*.

Comme dans l'étude de Bergougnoux et al. 2007, les quantités de chaque COV n'évoluent pas de la même façon au cours du développement floral. Par exemple pour *R. x hybrida* 'H190' (Figure 29), la quantité de E-2-hexénal est produite de façon constante pendant les trois premiers stades, puis diminue au stade FS, alors que le maximum de DMT est détecté au stade BO. Au stade FE et FS, les quantités de DMT sont plus faibles qu'aux stades

précédents. Ainsi, une étude plus approfondie a été réalisée sur la production de 2-phényléthanol afin de détecter à quel stade sa quantité est maximale (Figure 30).

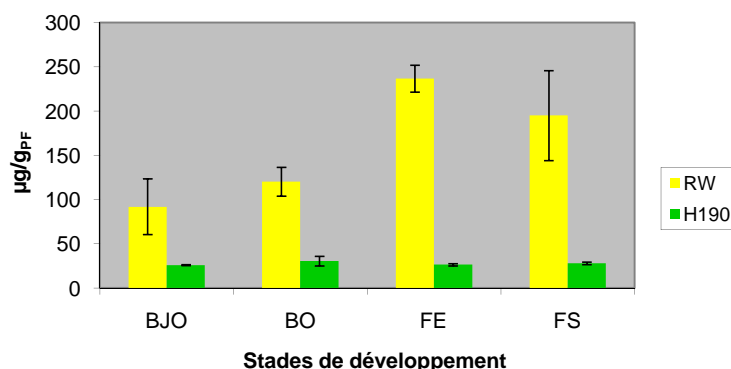


Figure 30 : évolution du 2-phényléthanol extrait des pétales au cours du développement floral des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190'. Les quantités sont exprimées en µg/g_{PF}. Les barres représentent l'écart type.

Pour *R. wichuraiana*, les quantités produites de 2-phényléthanol détectées augmentent au cours du développement de la fleur jusqu'au stade FE. C'est à ce stade que la production de 2-phényléthanol est maximale. En effet, la concentration passe de 92 ± 31 µg/g_{PF} au stade BJO à 237 ± 15 µg/g_{PF} au stade FE. Elle diminue ensuite lors de la sénescence des pétales. Au contraire, pour *R. x hybrida* 'H190', la production de 2-phényléthanol reste faible et constante au cours du développement de la fleur. Elle se situe toujours entre $25 \pm 0,6$ µg/g_{PF} et $26 \pm 1,2$ µg/g_{PF}.

En conclusion, la comparaison de l'évolution du 2-phényléthanol chez les parents montre bien une différence significative de production. L'analyse de *R. x hybrida* 'H190' ne permettant pas de mettre en évidence un stade de développement floral où la quantité de 2-phényléthanol est produite en plus grande quantité, l'expression du gène *RhPAAS* est étudiée au stade FE puisque c'est à ce stade que le maximum de 2-phényléthanol est retrouvé chez *R. wichuraiana*.

C. Corrélation entre production et émission de COV

Un des problèmes majeurs de l'étude des COV est que certains sont produits mais non émis, et d'autres ne sont synthétisés et émis que lors d'une blessure. Il peut donc arriver que la

composition des COV obtenue par extraction dans un solvant soit différente de celle des COV obtenue par récupération des effluves au dessus des pétales. Toujours dans le but de maîtriser parfaitement notre modèle, nous avons cherché à vérifier ce point.

1. Emission des COV par les fleurs

L'étude de l'émission des COV du parfum chez les variétés *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' au stade FE a été réalisée grâce à une technique classique de « headspace » dynamique dans laquelle plusieurs fleurs sont enfermées dans un sac en plastique inerte. Pendant 3 h, les COV sont piégés sur une résine Tenax, puis élués par de l'hexane et analysés en CPG-FID. Afin de minimiser les variations environnementales, les fleurs au stade FE sont analysées à la même heure de la journée. Trois répétitions sur ces deux variétés sont réalisées au stade FE. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 31).

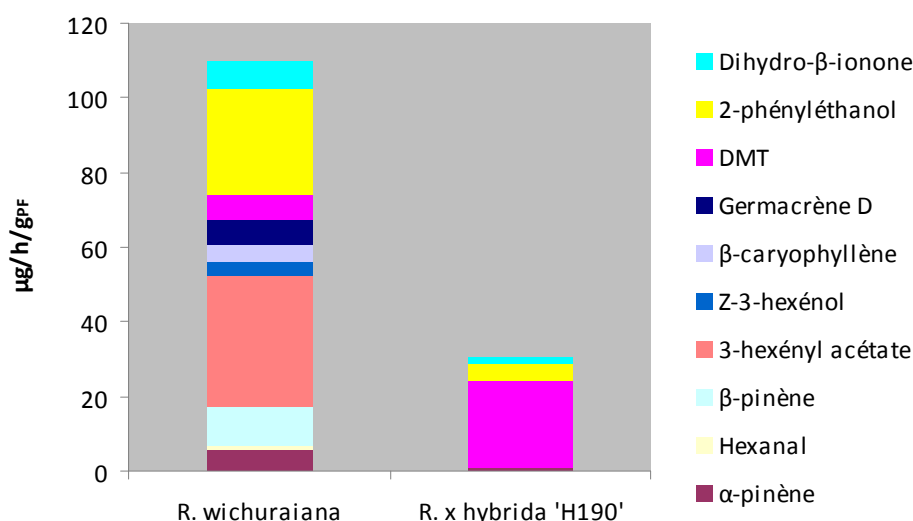


Figure 31 : composés organiques volatils émis par les fleurs analysés en headspace au stade FE sur la population HW. Les quantités sont exprimées en µg/h/g_{PF}.

Les quantités totales de COV émis sont plus importantes pour *R. wichuraiana* avec 109,6 µg/h/fleur que pour *R. x hybrida* 'H190' avec 30,3 µg/h/g_{PF}.

Toutes les classes de COV sont représentées chez les deux parents : acides gras, composés aromatiques et terpènes. Les composés aromatiques restent la classe dominante des COV puisqu'ils représentent 32 % pour *R. wichuraiana* et 90 % pour *R. x hybrida* 'H190'. Parmi ces composés, le 2-phényléthanol est prédominant pour *R. wichuraiana* avec 26 % des COV

totaux. Pour *R. x hybrida* 'H190', le 2-phényléthanol ne représente que 15 % des COV totaux alors que le DMT est émis en quantité très importante avec 76 % des COV totaux.

Outre les composés aromatiques, les terpènes sont des composés du parfum puisqu'ils représentent 31 % pour *R. wichuraiana* et 8 % des COV totaux pour *R. x hybrida* 'H190'. Par exemple, les COV émis sont des isomères du pinène avec 10 % pour *R. wichuraiana*.

Les fleurs émettent aussi des acides gras odorants comme hexénal, Z-3-hexénol, Z-3-hexényl acétate. Ils représentent 1 % pour *R. x hybrida* 'H190' et 37 % des COV totaux pour *R. wichuraiana*.

2. Corrélation entre la production et l'émission des COV.

La composition en COV des extraits et de ceux émis en « headspace » pour les variétés *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' sont comparés. Les COV des sépales, pétales et étamines sont extraits dans l'hexane et comparés aux COV émis par la fleur entière (Figure 31). Les résultats sont présentés dans la Figure 32.

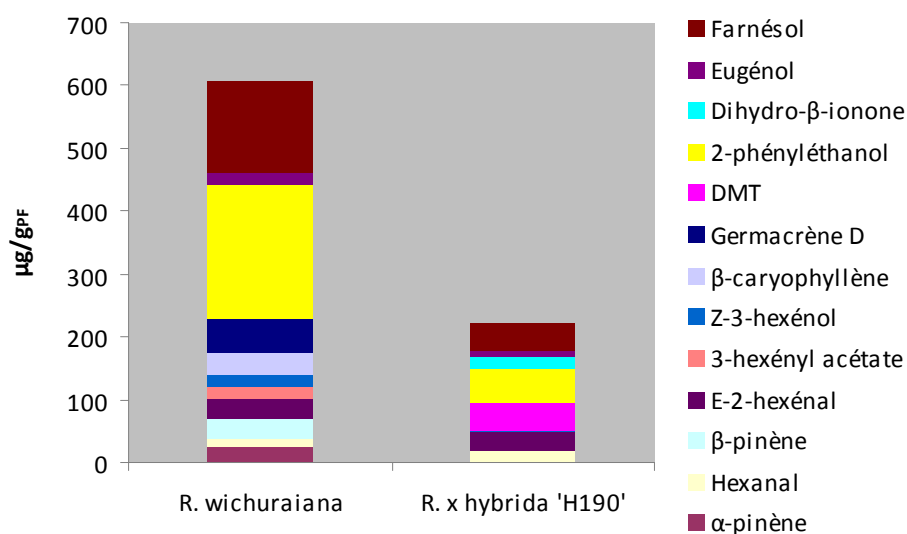


Figure 32 : composés organiques volatils produits par les fleurs des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' au stade FE. Les quantités sont exprimées en µg/g_{PF}. Cette figure reprend les données de la Figure 28 où les valeurs des trois organes sont additionnées.

Parmi les COV totaux émis, 10 sur les 14 COV sont présents également dans les extraits des différents organes floraux de *R. wichuraiana*. Par exemple, le 2-phényléthanol, l'hexanal, le germacrène D sont retrouvés dans ce cas. En ce qui concerne *R. x hybrida* 'H190', 5 COV sur

les 10 COV totaux émis sont présents également dans les extraits des différents organes floraux. Par exemple, le DMT, le 2-phényléthanol et la dihydro- β -ionone sont retrouvés dans ce cas.

Pour des raisons inconnues, le DMT et la dihydro- β -ionone ne semblent pas produits alors que ces composés sont émis pour la variété *R. wichuraiana*. Ce cas est retrouvé pour α -pinène de la variété *R. x hybrida* 'H190'.

D'autres COV sont présents dans les tissus de la fleur mais ne sont pas émis. C'est le cas pour quatre composés : le E-2-hexénal et l'eugénol pour les deux variétés, mais aussi le farnésol et le Z-3-hexénol pour *R. x hybrida* 'H190'. L'absence de ces composés en « headspace » pourrait être expliquée par leur volatilité. En effet, la volatilité d'un COV est déterminé par son point d'ébullition. Plus celui-ci est fort, moins le COV est émis rapidement, c'est le cas de l'eugénol qui a un point d'ébullition de 254°C. Ce composé étant très peu volatil, il n'a pas été détecté en « headspace ». Le E-2-hexénal, le farnésol et le Z-3-hexénol ont un point d'ébullition faible donc sont volatils mais leur absence en « headspace » peut être expliquée par les faibles quantités de ces COV stockées à l'intérieur des tissus floraux c'est-à-dire inférieurs à 5 % des COV totaux ou bien par le fait que ces COV seraient absents du contenu cellulaire mais synthétisés au moment du prélèvement pour extraction, occasionnés par exemple, lors de la blessure. C'est le cas des acides gras odorants comme le E-2-hexénal et le Z-3-hexénol qui sont souvent synthétisés suite à une blessure. Il y aurait donc une synthèse de ces composés lors du prélèvement des tissus, cette étape étant obligatoirement traumatique. Par contre, pour « l'headspace », la fleur entière est prélevée, avec son pédoncule. Il y a donc moins de blessures au niveau des tissus et donc moins de dérivés d'acides gras.

En conclusion, malgré des petites différences entre extraction et « headspace », il existe, chez ces roses parfumées, une corrélation étroite entre ce qui est à l'intérieur des différents organes floraux et ce qui est émis par la fleur au stade FE. Ainsi, l'analyse du parfum pour la suite des résultats a été réalisée en extraction.

II. Etude de l'expression du gène *RhPAAS* dans la population HW

La compréhension de la production et de l'émission du parfum chez la rose passe par la caractérisation des enzymes responsables de la synthèse des COV. Les composés aromatiques, notamment le 2-phényléthanol, représente une proportion importante des COV dans la population HW. Le 2-phényléthanol est synthétisé à partir d'un acide aminé aromatique, la 2-phénylalanine, la première étape étant une réaction catalysée par la phénylacétaldéhyde synthase (PAAS). Cette enzyme a fait l'objet d'études où son gène a été notamment cloné et séquencé (Kaminaga et al., 2006). La séquence isolée chez la rose est appelée *RhPAAS* quand il s'agit de la séquence nucléotidique et RhPAAS quand il s'agit de la séquence protéique, conformément aux règles de nomenclature.

A. Profils d'expression du gène *RhPAAS* au stade FE

Afin d'étudier l'expression du gène *RhPAAS*, des RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques dessinées à partir de la séquence clonée *RhPAAS* de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud', disponible dans la banque de données NCBI (numéro d'accèsion DQ 192639).

Parmi les trois couples d'oligonucléotides utilisés, les deux couples d'amorces internes au gène permettent d'amplifier respectivement un fragment de 800 pb et 1100 pb à partir de l'ADNc issu d'ARN extrait de pétales de la population HW. Un couple d'amorces UTR a aussi été défini à partir de la même séquence *RhPAAS* clonée permettant d'amplifier l'ADNc du gène dans sa totalité soit 1400 pb (Annexe 5). L'expression du gène est suivie au stade FE. Le gène codant la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de rose (*RhGAPDH*) est utilisé comme référence pour normaliser les différents échantillons d'ADNc utilisés. L'ensemble a été comparé aux concentrations de 2-phényléthanol pour établir une corrélation entre l'expression du gène dans les pétales de roses et la production de 2-phényléthanol. La Figure 33 représente les résultats de RT-PCR obtenus pour cette expérience.

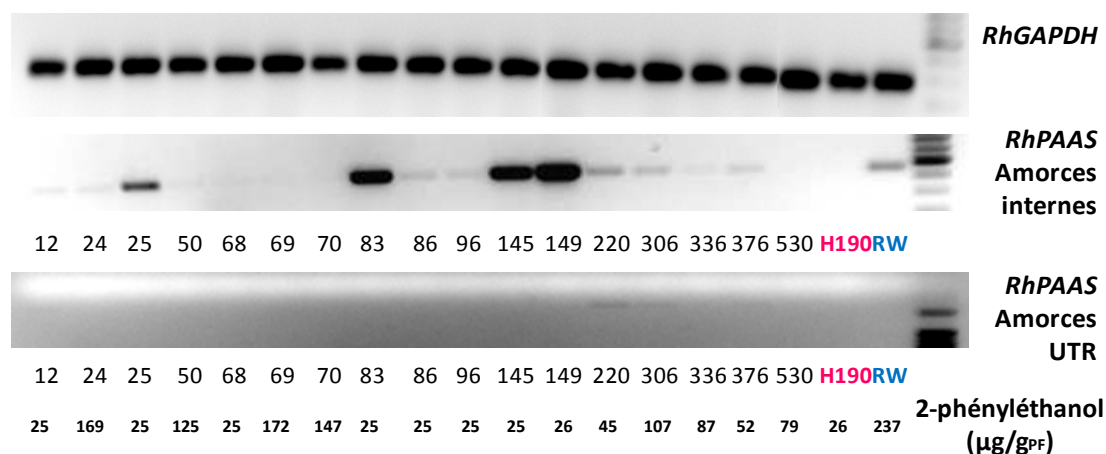


Figure 33 : RT-PCR semi-quantitative du gène *RhPAAS* des pétales de roses au stade FE sur une partie de la population HW. Quel que soit le couple d'amorces internes, les résultats obtenus sont identiques, un seul cas est présenté. Les quantités de 2-phényléthanol, extraits des pétales de roses au stade FE sur une partie de la population HW, sont exprimées en $\mu\text{g/g}_{\text{PF}}$. La taille d'un fragment peut être estimée par comparaison avec un standard de taille tel que le marqueur 100pb DNA ladder (Promega). Les tailles obtenues avec les deux couples d'amorces internes sont 800 pb et 1100 pb. La taille obtenue pour *RhGAPDH* est de 300 pb.

Différents profils d'expression sont trouvés. Dans certains cas comme le descendant 149, il y a une forte expression de *RhPAAS*, tandis que dans d'autres cas tels que pour les descendants 306 ou 70, l'expression de *RhPAAS* est très faible voire nulle. Afin de corrélérer ces résultats avec la quantité de 2-phényléthanol produit, l'analyse de sa production est réalisée sur les pétales par extraction à l'hexane. Selon les résultats, les variétés de roses peuvent être réparties en deux catégories. Les variétés 24, 50, 69 et 70 produisent une très grande quantité de 2-phényléthanol (125 à 172 $\mu\text{g/g}_{\text{PF}}$). Une quantité plus importante de ce COV est produite soit environ 237 $\mu\text{g/g}_{\text{PF}}$ chez la variété *R. wichuraiana*. La deuxième catégorie produit une très faible quantité de 2-phényléthanol, soit 25 $\mu\text{g/g}_{\text{PF}}$, comme notamment la variété *R. x hybrida* 'H190' et les descendants 86, 145 et 149. Les résultats montrent une bonne corrélation chez les parents puisque pour la variété *R. wichuraiana*, l'ADNc *RhPAAS* amplifié avec des amorces internes, montre une forte expression qui est corrélée avec une grande quantité de 2-phényléthanol produit. En revanche, la variété *R. x hybrida* 'H190' n'exprime pas *RhPAAS* et produit peu de 2-phényléthanol. Pour les descendants cependant, aucune corrélation n'est montrée entre l'expression du gène *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol. Par exemple, certains descendants qui produisent peu de 2-phényléthanol expriment fortement l'ADNc *RhPAAS*. Ce qui est le cas pour les variétés 145 et 149. Les

descendants 220 et 306 qui produisent une quantité non négligeable de ce COV, expriment faiblement le gène. Il n'y a pas d'expression pour les variétés 50 et 69 qui produisent une grande quantité de 2-phényléthanol. Avec les amorces UTR, aucune expression de l'ADNc de *RhPAAS* n'est montrée chez les parents.

Afin de vérifier la validité des résultats de RT-PCR, des PCR quantitatives ont été réalisées sur quelques descendants (Figure 34).

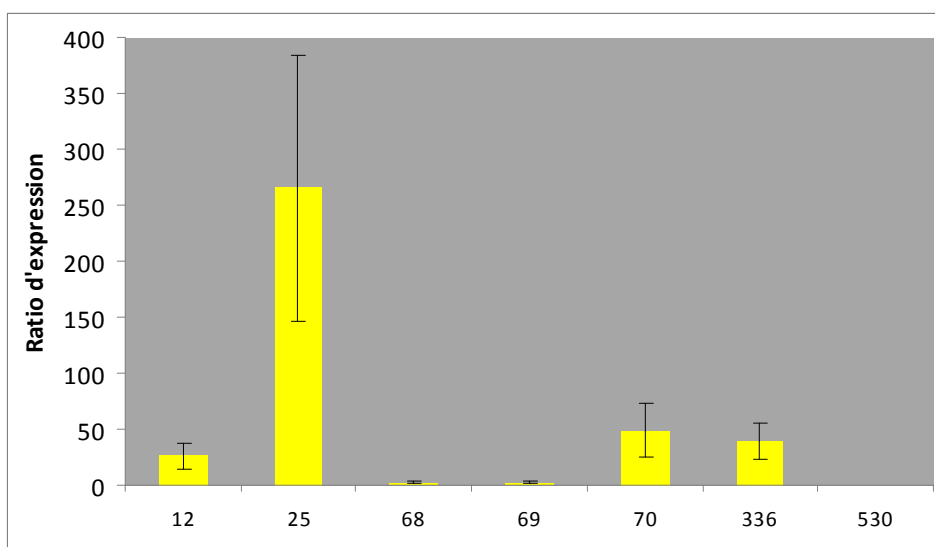


Figure 34 : RT-PCR quantitative du gène *RhPAAS* des pétales de roses sur quelques descendants de la population HW au stade FE. L'ordonnée du graphique est exprimée en ratio d'expression.

Pour les descendants 12, 68, 69, produisant peu de 2-phényléthanol, le niveau d'expression de *RhPAAS* est faible. Pour les descendants 70 et 530, produisant une quantité importante de 2-phényléthanol, le niveau d'expression reste également faible. Pour le descendant 25, produisant une quantité négligeable de 2-phényléthanol, le niveau d'expression de *RhPAAS* est important, 150 fois plus exprimé que chez les descendants 12 et 70. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus en PCR semi-quantitative.

En conclusion, il n'y pas de corrélation entre l'expression du gène et la production du parfum au stade FE. Ce résultat troublant, ainsi que l'absence d'amplification avec les amorces UTR pourtant spécifiques, nous a conduit à tester d'autres conditions.

B. Profils d'expression du gène *RhPAAS* au cours du développement floral

Dans notre expérience précédente, nous n'avons pas pu corréler l'expression du gène *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol au stade FE. Nous nous interrogeons sur le profil d'expression du gène *RhPAAS*. Pour déterminer le niveau maximal d'expression de l'ADNc, une RT-PCR est réalisée sur les pétales des deux parents au cours du développement floral. Les réactions de RT-PCR semi-quantitatives ne sont réalisées qu'une seule fois (Figure 35). Le gène *RhGAPDH* est utilisé comme référence pour normaliser les différents échantillons d'ADNc.

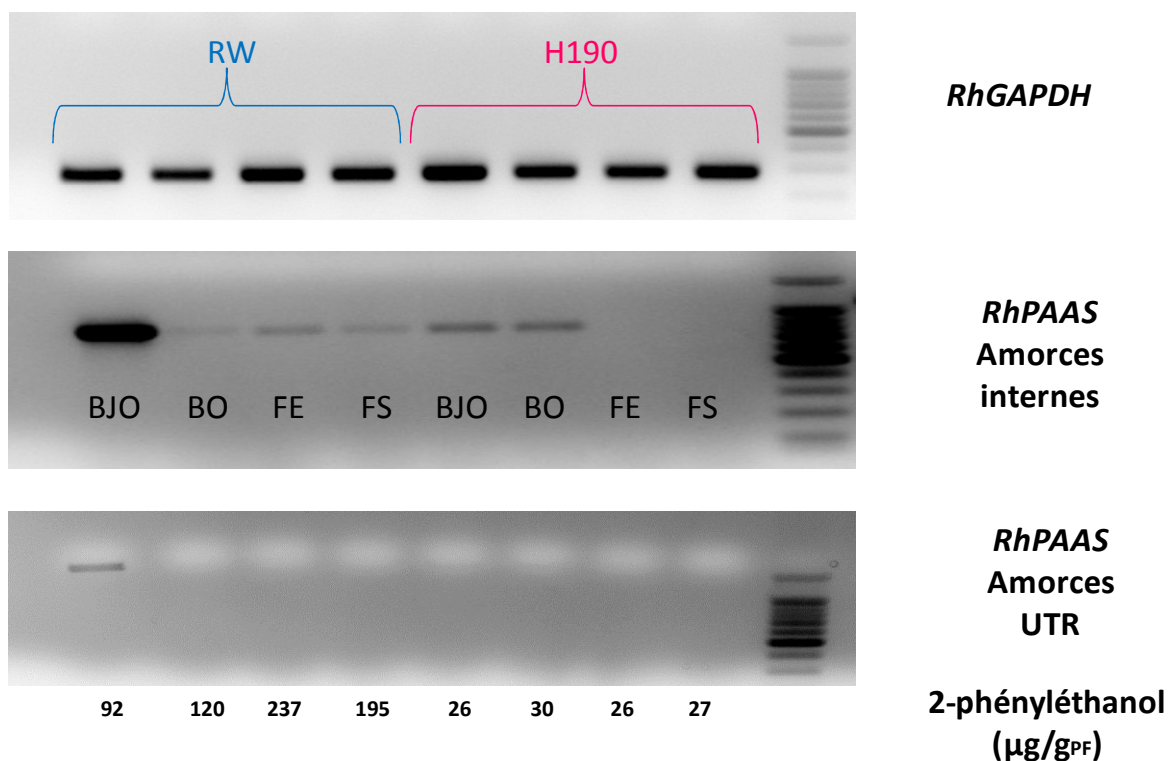


Figure 35 : RT-PCR semi-quantitative du gène *RhPAAS* des pétales des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' au cours du développement floral. La taille d'un fragment peut être estimée par comparaison avec un standard de taille tel que le marqueur 100pb DNA ladder (Promega). La taille obtenue avec un couple d'amorces internes est 1100 pb. Avec les amorces UTR, la taille obtenue est de 1400 pb.

Le gène *RhPAAS* du parent *R. wichuraiana*, amplifié avec les amorces internes, est exprimé aux quatre stades de développement floral testés. Le niveau maximal d'expression de *RhPAAS* est atteint au stade BJO. Un faible niveau d'expression est constaté pour les trois autres stades

(BO, FE, FS). Pour le parent *R. x hybrida* 'H190', seuls les stades BJO et BO montrent une expression du gène *RhPAAS*. L'ARNm du gène n'est pas présent, pour les stades plus tardifs.

Lorsqu'il est amplifié avec les amorces UTR, cet ARNm est absent chez le parent *R. x hybrida* 'H190' à tous les stades et n'est présent qu'au stade BJO chez le parent *R. wichuraiana*. On pourrait émettre l'hypothèse que l'efficacité de ce couple d'amorces est sans doute faible ou moindre par rapport aux couples internes. Afin de vérifier la validité des résultats de RT-PCR, quelques PCR quantitatives ont été réalisées sur les parents (Figure 36). Cette technique permet l'obtention de résultats plus précis qu'en PCR semi-quantitative.

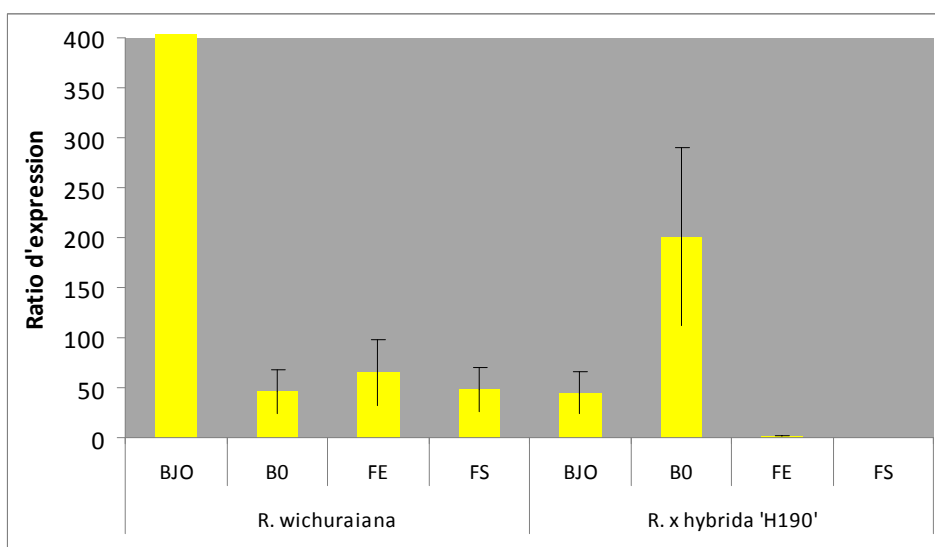


Figure 36 : RT-PCR quantitative du gène *RhPAAS* des pétales de roses sur une partie de la population HW. Etude des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' sur les quatre stades de développement floral. Ce graphique est zoomé afin de visualiser les ratios de faible expression comparés à celui de RW au stade BJO qui est de 3808. L'ordonnée du graphique est exprimée en ratio d'expression.

Le niveau d'expression de *RhPAAS* est maximal au stade BJO pour *R. wichuraiana* et il devient constant pour les stades BO, FE, FS. Pour *R. x hybrida* 'H190', le niveau d'ARN au stade BO est deux fois plus important qu'au stade BJO. Aucune expression n'est signalée aux stades plus tardifs (FE, FS).

Afin d'étendre cette corrélation, des amplifications de l'ARNm au stade BJO ont été réalisées sur quatorze descendants présentant des taux variables de 2-phényléthanol (Figure 37).

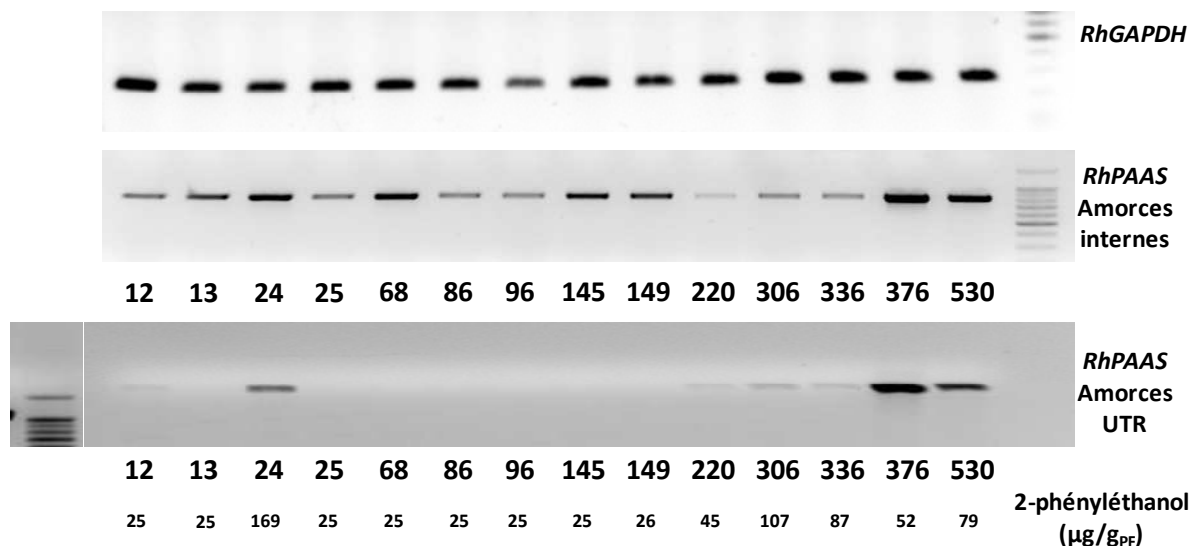


Figure 37 : RT-PCR semi-quantitative du gène *RhPAAS* des pétales de roses au stade BJO sur 14 descendants de la population HW. Quel que soit le couple d'amorces internes, les résultats obtenus sont identiques, un seul cas est présenté. Les quantités de 2-phényléthanol extraits des pétales de roses au stade FE sur une partie de la population HW sont exprimées en μg/g_{PF}. La taille d'un fragment peut être estimée par comparaison avec un standard de taille tel que le marqueur 100pb DNA ladder (Promega). La taille obtenue avec un couple d'amorces internes est de 1100 pb. Avec les amorces UTR, la taille obtenue est de 1400 pb.

Les résultats de l'amplification de l'ADNc de *RhPAAS* avec les amorces internes montrent qu'il n'y a aucune corrélation entre l'expression du gène et la production de 2-phényléthanol. En effet, les descendants qui produisent une faible ou une importante quantité de 2-phényléthanol, expriment toujours le gène *RhPAAS* avec une intensité plus ou moins forte. Lorsque l'ADNc de *RhPAAS* est amplifié avec les amorces UTR, une corrélation est observée. Seuls les descendants produisant une quantité importante de 2-phényléthanol expriment le gène *RhPAAS*. Il existe donc une corrélation entre l'expression du gène *RhPAAS* au stade BJO et l'émission de 2-phényléthanol au stade FE. De plus, ce résultat permet de supposer l'existence d'autres allèles du gène amplifiés avec les amorces internes. En effet, la séquence codante est toujours plus conservée que les séquences UTR et une amplification sur celle-ci a alors de fortes chances d'amplifier aussi des allèles similaires.

III. Etude des différentes copies du gène *RhPAAS* dans la population HW

A. Etude de l'ADN génomique de *RhPAAS*

Les travaux précédents semblent montrer que les amorces internes et UTR n'amplifient pas les mêmes allèles du gène *RhPAAS*. Afin de mettre ces allèles en évidence, le séquençage du gène *RhPAAS* à partir de l'ADN génomique des deux parents a été nécessaire. Une technique classique de clonage est utilisée et une vingtaine de clones sont obtenus pour chacun des parents, *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190'. Les séquences obtenues en acides nucléiques de l'ADN génomique de *RhPAAS* sont traduites en protéines. Pour s'assurer que les séquences obtenues après séquençage sont bien celle de *RhPAAS*, elles sont comparées avec le logiciel Blast à toutes les séquences enregistrées dans les bases de données. La séquence protéique déduite de l'ADN génomique isolé chez la rose présente un niveau d'identité très élevé avec les autres PAAS connues comme celles de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' ou de *R. x damascena* (98 % d'identité) (Annexe 5). Afin de mettre en évidence les différents allèles de *RhPAAS* chez les deux parents, les séquences protéiques sont alignées dans Bioedit. Les résultats sont présentés Tableau 20.

Tableau 20 : comparaison des acides aminés des séquences protéiques déduites des séquences nucléiques de *RhPAAS* des deux parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' à celle de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' (Kaminaga et al., 2006); coloré en vert, acides aminés identiques ; coloré en jaune : acides aminés différents.

Allèles		a1	a2	a3
Variétés	Kaminaga	RW	RW	H190
Positions				
83	N	D	D	
184	R	L		
188	S	R	R	
234	S			L
259	I	M	M	M
281	G			S
375	A	S		
382	L			I

Pour montrer les différences alléliques, les séquences obtenues ont été comparées à la séquence protéique *RhPAAS* de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' caractérisée par Kaminaga et al. (2006). La protéine *RhPAAS* est constituée de 509 acides aminés, soit une masse

moléculaire calculée proche de 57 KDa. Dans le Tableau 20, la couleur verte représente les acides aminés identiques entre les séquences obtenues et celle obtenue par Kaminaga et al. Les différences d'acides aminés sont notées en jaune. Pour la variété *R. wichuraiana*, deux séquences peu différentes en acides aminés sont observées. Il est intéressant de noter qu'aucune des séquences protéiques ne correspond à celle clonée par Kaminaga. La première séquence, notée a1, possède 5 différences en acides aminés en position 83, 184, 188, 259, 375 (Annexe 5). Par exemple, en position 184, une leucine non polaire aliphatique est remplacée par une arginine, polaire chargée positivement. La deuxième séquence, notée a2 (Annexe 5), montre trois acides aminés différents en position 83, 188 et 259. Ces résultats semblent donc indiquer que la variété *R. wichuraiana* possède deux copies de *RhPAAS*. *R. wichuraiana*, hétérozygote, présente un génotype a1/a2. Pour *R. x hybrida* 'H190', une seule séquence est observée sur la vingtaine de clones. Quatre acides aminés, en position 234, 259, 281, 382, diffèrent de ceux obtenus par Kaminaga. Par exemple, en position 259, la méthionine est substituée en isoleucine qui sont toutes les deux des acides aminés non polaires. Aucune autre séquence n'a été obtenue chez *R. x hybrida* 'H190' (Annexe 5). *R. x hybrida* 'H190' présenterait donc un génotype a3/a3. Les quelques différences d'acides aminés entre les différentes protéines pourraient éventuellement modifier la structure tridimensionnelle de l'une d'entre elles, ce qui engendrerait éventuellement une perte de fonction ou une modification d'activité même si nous avons constaté que ces substitutions ne s'étaient pas faites dans les sites actifs. Trois autres allèles, notés b, ont été séquencés sur l'ADN génomique des deux parents (Annexe 5). Leurs séquences protéiques sont très différentes de celles correspondantes aux allèles a et il a été impossible d'obtenir des ADNc de ces allèles à partir des pétales. Il ne peut donc pas s'agir du gène *RhPAAS* qui nous intéresse.

B. Expression des allèles selon les individus

Pour étudier l'expression des allèles de *RhPAAS* dans la population HW, les ADNc correspondant au gène *RhPAAS* ont été clonés aux stades BJO et FE et sont séquencés. Cette étude a été complétée avec une vingtaine de clones d'ADNc des parents *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190'. Deux groupes de descendants, ceux qui produisent une quantité importante de 2-phényléthanol comme le parent *R. wichuraiana* et ceux qui en produisent peu comme *R. x hybrida* 'H190', ont été choisis. Les résultats sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : expression des allèles du gène *RhPAAS* chez quelques individus de la population HW au stade BJO et FE. – indique les individus produisant peu de 2-phényléthanol et +, les individus produisant beaucoup de 2-phényléthanol.

	Stades	2-phényléthanol en FE	Allèles exprimés
RW	BJO, FE	+	a1
H190	BJO	-	a3
24	BJO	+	a1
306	BJO, FE	+	a1
376	BJO, FE	+	a1
530	BJO	+	a1
83	FE	-	a2
145	FE	-	a2
68	BJO	-	a2
149	BJO	-	a2

Les variétés de roses produisant une grande quantité de 2-phényléthanol comme *R. wichuraiana* et les descendants 24, 306, 376, 530, expriment uniquement l'allèle a1, aux stades BJO et FE. L'allèle a2 n'est jamais séquencé chez *R. wichuraiana*, ce qui semble indiquer qu'il ne s'exprime pas ou peu. *R. x hybrida* 'H190', produisant une faible quantité de 2-phényléthanol, exprime l'allèle a3 de *RhPAAS* au stade BJO. Les descendants 24, 306, 376, 530, produisant beaucoup de parfums, expriment la copie a1. Les descendants 83, 145, 68 et 149, produisant peu de 2-phényléthanol, expriment la copie a2 au stade FE. Il semblerait donc que la copie a1 soit liée à la production de parfum alors que la copie a2 produirait une protéine non fonctionnelle.

Etude de la biosynthèse du 2-phényléthanol par une approche génétique : conclusion et discussion

Notre deuxième objectif a été d'étudier la voie de biosynthèse responsable de la formation du 2-phényléthanol. Nous nous sommes tout d'abord concentrés sur le choix du stade de développement de la fleur et de l'organe pour lesquels la quantité de 2-phényléthanol est maximale. Nous avons ensuite cherché à corréler l'expression du gène *RhPAAS* et la production du 2-phényléthanol chez la population HW et à mettre en évidence plusieurs allèles du gène, ainsi qu'à constater leurs liens avec la production de 2-phényléthanol. A la lumière des résultats obtenus, les points suivants peuvent être discutés.

I. Corrélation entre la production et l'émission du 2-phényléthanol

A. Choix du stade FE de floraison

Une relation entre la production de parfum et l'épanouissement de la fleur a été mise en évidence dans notre travail. En effet, nos résultats montrent que pour la variété *R. wichuraiana*, la quantité de COV totaux des pétales augmente au cours de l'épanouissement de la fleur. Les mêmes observations ont déjà été faites chez d'autres roses. Chez la variété de rose très parfumée *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud', le niveau le plus important de COV émis par les fleurs étant observé lorsque la fleur est complètement ouverte (Guterman et al., 2002 ; Shalit et al., 2004). Chez *R. x hybrida* 'Papa Meilland' (Bergougnoux et al., 2007), les quantités de COV totaux augmentent aussi au cours du développement de la fleur. Le maximum est retrouvé au stade BTO/FE avec un total de 41 µg/g_{PF} en BJO contre 428 µg/g_{PF} en FE. Chez d'autres espèces comme par exemple le tabac, *Nicotiana suaveolens*, les quantités de COV augmentent après ouverture complète de la fleur (Loughrin et al., 1992).

Par contre, cette relation entre la production de parfum et l'épanouissement de la fleur est moins nette pour *R. x hybrida* 'H190', le maximum de COV totaux étant détecté au stade BO. Ce décalage pour le stade de développement peut être expliqué par la production importante

de DMT au stade BO puisqu'il représente 80 % des COV totaux pour *R. x hybrida* 'H190'. Même si la majorité des quantités de COV totaux augmentent au cours du développement de la fleur, chaque COV n'évolue pas de la même façon. Par exemple, chez la rose parfumée *R. x hybrida* 'Papa Meilland', les quantités de DMT dans le pétale n'évoluent pas de la même façon que les quantités des autres COV. Le DMT représente un pourcentage légèrement plus important dans les stades précoces de développement (3,5 % au stade BO) qu'aux stades tardifs (1,6 % aux stades BTO/FE) (Bergougnoux et al., 2007). Chez l'œillet, Schade et al. (2001) suggèrent aussi une régulation développementale indépendante pour chaque composé.

En ce qui concerne le 2-phényléthanol, nous avons mis en évidence une relation avec l'épanouissement de la fleur. En effet, nos résultats montrent que pour la variété *R. wichuraiana*, la quantité de 2-phényléthanol augmente au cours du développement floral jusqu'au moment où la fleur est épanouie. Par contre, pour *R. x hybrida* 'H190' la quantité de 2-phényléthanol reste constante et faible tout au long du développement floral. Le stade FE a donc été conservé pour la suite de notre étude.

B. Choix de l'organe de la fleur

Si certains composés sont communs aux trois organes, les proportions n'en restent pas moins différentes pour chaque organe. Par exemple, la classe des acides gras représente 23 % dans les sépales de *R. wichuraiana* contre 1,7 % dans les pétales, et 57 % dans les sépales de *R. x hybrida* 'H190' contre 28 % dans les étamines. La composition en COV des différents organes ne sont pas exactement les mêmes entre notre étude et celle de Dobson et al. (1990). Ceci peut s'expliquer par le fait que ce sont des roses d'origines différentes. Les sépales des variétés *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190' renferment essentiellement des dérivés d'acides gras, alors que ceux de *R. rugosa* produisent surtout des sesquiterpènes. Pour expliquer cette différence, il est important de souligner que les COV extraits des pétales de *R. rugosa* appartiennent majoritairement à la famille des terpènes et des composés aromatiques. En revanche, les odeurs des différentes parties de la fleur sont les mêmes dans notre étude et celle effectuée sur *R. x hybrida* 'Papa Meilland' (Bergougnoux et al., 2007).

Le 2-phényléthanol est prédominant chez *R. wichuraiana* puisqu'il représente 16 % des composés aromatiques dans les sépales et les étamines et 68 % dans les pétales. Pour *R. x hybrida* 'H190', le 2-phényléthanol est absent dans les sépales mais représente 21 % dans les pétales et 40 % dans les étamines. Mais compte tenu de la différence de quantité des COV totaux produits entre les deux variétés, le 2-phényléthanol est en quantité négligeable dans les

pétales de *R. x hybrida* 'H190'. Chez ces deux variétés de roses, les pétales sont la source majeure des COV totaux, notamment du 2-phényléthanol, devant les étamines puis les sépales. Ces résultats concordent avec ceux de Bergougnoux et al. (2007) où la fragrance de la fleur est majoritairement due aux pétales. Chez *R. x hybrida* 'Papa Meilland', le 2-phényléthanol est en quantité équivalente entre les pétales et les étamines. Cependant comme le poids des étamines est plus faible que celui des pétales, le 2-phényléthanol et les autres COV sont considérés comme majoritaires dans les pétales (Bergougnoux et al., 2007)

Nous avons donc continué notre étude uniquement sur les pétales au stade FE.

C. Corrélation entre production et émission du 2-phényléthanol

Chez les roses parfumées, des petites différences entre la production et l'émission des COV ont été notées. Cependant une corrélation existe entre ce qui est à l'intérieur des différents organes floraux et ce qui est émis par la fleur au stade FE. Certains COV sont présents dans les tissus de la fleur mais ne sont pas émis au stade FE. Plusieurs explications peuvent être proposées. Les faibles quantités de ces COV, inférieurs à 5 %, stockés à l'intérieur des tissus floraux, sont peut être émis en trop faible quantité pour être détectés. De plus, la capture des COV émis reste une technique difficile car ils sont sous l'influence des conditions extérieures. Par exemple, si la température ambiante est élevée, les COV seront émis rapidement. Pour que les variations dues au rythme d'émission des COV et aux conditions environnementales ne perturbent pas l'expérimentation, il faut faire des analyses à des intervalles de temps rapprochés. Une autre hypothèse peut être avancée selon laquelle ces composés seraient émis en décalage par rapport à leur biosynthèse. Des études des rythmes d'émission des COV montrent qu'ils peuvent être spécifiques pour un composé. Par exemple, chez *Rosa x hybrida* 'Honesty', la dihydro- β -ionone a un rythme d'émission particulier (Helsper et al., 1998).

R. wichuraiana émet une quantité importante de 2-phényléthanol ce qui est en accord avec les analyses d'extraction des COV dans les pétales de rose. Tandis que *R. x hybrida* 'H190' en émet une quantité négligeable ce qui reste en accord avec sa faible production. Nous avons donc utilisé l'extraction sur pétales des fleurs au stade FE pour la suite de notre travail.

II. Corrélation entre l'expression du gène *RhPAAS* au stade BJO et la production de 2-phényléthanol au stade FE

Dans la suite de notre étude, nous avons cherché à corréler la production du 2-phényléthanol à l'expression du gène *RhPAAS*.

Au stade FE, une corrélation entre l'expression du gène *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol a été observée chez les parents mais pas chez les descendants (population HW). Chez les parents, seul *R. wichuraiana*, présente à la fois une forte expression de *RhPAAS* et une grande quantité de 2-phényléthanol. Dans la population HW, les descendants avec ou sans expression de *RhPAAS* peuvent présenter beaucoup ou peu de 2-phényléthanol.

A la vue de ces résultats surprenants, nous nous sommes interrogés sur le profil d'expression du gène *RhPAAS* au cours du développement floral. Pour les deux parents, le niveau maximal d'expression de *RhPAAS*, amplifié avec les amorces internes, est atteint au stade BJO avec une très forte expression pour *R. wichuraiana*. Avec les amorces UTR, beaucoup plus spécifiques, l'expression de *RhPAAS* n'est observée qu'au stade BJO de *R. wichuraiana*. De plus, dans la population HW, lorsque l'ADNc est amplifié avec les amorces UTR, seuls les descendants produisant une quantité importante de 2-phényléthanol expriment le gène *RhPAAS*. Le même phénomène est observé chez *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' où le transcrit est accumulé au stade BJO dans les pétales c'est-à-dire avant le maximum d'émission du parfum (Farhi et al., 2010). Il y a donc un décalage entre l'expression du gène *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol. Le 2-phényléthanol serait produit au stade BJO et pourrait être stocké pour être ensuite émis au stade FE. Selon certains auteurs, les parfums seraient déjà présents sous une forme glycosylée non volatile dans les pétales dès les stades précoces de développement (Ackerman et al., 1989 ; Riou et al., 1998 ; Reuveni et al., 1999 ; Jakobsen et Christensen, 2002 ; Hayashi et al., 2004). Ainsi, chez le narcisse, l'augmentation de la production des COV est liée à l'augmentation de l'activité β -glucosidase (Reuveni et al., 1999). Chez *R. x damascena*, la quantité de 2-phényléthanol glycosylé, produit dans les stades précoces, diminue au cours du développement floral alors que l'activité de la β -glucosidase augmente, parallèlement à l'augmentation de la quantité de 2-phényléthanol (Watanabe et al., 2002). Ainsi, ces formes conjuguées pourraient avoir un rôle de stockage des COV. Dans notre étude, une analyse du 2-phényléthanol glycosylé et sa forme volatile au cours du développement floral de la rose serait intéressante.

De plus, cette expérience permet de mettre en évidence que les deux couples d'amorces, internes et UTR, n'amplifient pas les mêmes allèles. L'ADNc de *RhPAAS* aux stades BJO et FE, amplifié avec les amorces internes, montre qu'il n'y a aucune corrélation entre l'expression du gène et la production de 2-phényléthanol. En effet, les descendants qui produisent une faible ou une importante quantité de 2-phényléthanol, expriment toujours le gène *RhPAAS* avec une intensité plus ou moins forte. Il semblerait que ces couples d'amorces internes amplifient un mélange d'allèles tandis que les amorces UTR amplifieraient qu'un seul allèle de *RhPAAS* car seuls les descendants produisant une grande quantité de 2-phényléthanol l'exprime.

III. Corrélation entre l'allèle a1 et la production de 2-phényléthanol

Trois allèles différents ont été séquencés chez *R. wichuraiana* et *R. x hybrida* 'H190'. Nos résultats semblent indiquer que la variété *R. wichuraiana* possède deux allèles et présente un génotype a1/a2. Ce résultat est corrélé avec le génotype de *R. wichuraiana* obtenu en SSCP où il a été mis en évidence que le parent mâle possède deux allèles différents. Pour *R. x hybrida* 'H190', un seul allèle noté a3 est observé. *R. x hybrida* 'H190', il présenterait un génotype a3/a3 ce qui est également en accord avec les données récupérées grâce à la technique SSCP (Annexe 1) pour lesquelles le parent femelle possède un seul allèle. De plus, ceci confirme les données connues sur ces rosiers où la variété *R. wichuraiana* est un rosier diploïde et *R. x hybrida* 'H190' un rosier dihaploïde.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'expression de ces allèles chez les parents et la descendance et nous avons cherché à comprendre les résultats de chaque allèle (Figure 38). Il semblerait que l'allèle a1 soit lié à la production du 2-phényléthanol. Il ne s'exprime que chez les variétés de roses produisant une grande quantité de 2-phényléthanol comme *R. wichuraiana* et les descendants 24, 306, 376, 530. Ce phénomène est décrit pour la première fois.

L'allèle a2 s'exprime uniquement chez les roses produisant très peu de 2-phényléthanol. L'allèle a2 pourrait donc coder pour une protéine peu ou pas fonctionnelle. En comparant les séquences protéiques a1 et a2, seulement deux acides aminés sont différents et ils ne sont pas localisés au niveau du site catalytique. Il y a donc de faible chance pour que le changement de ces deux acides aminés modifie la structure tridimensionnelle de la protéine a2. Pour

expliquer que ces roses produisent très peu de 2-phényléthanol, il faudrait peut être s'intéresser aux régulations transcriptionnelles.

A l'état homozygote, chez *R. x hybrida* 'H190', l'allèle a3 s'exprime, il est corrélé à la présence d'une petite quantité de 2-phényléthanol. Lui-aussi pourrait donc donner une protéine peu ou pas fonctionnelle. Par contre, à l'état hétérozygote, donc dans la population HW, il n'est jamais séquencé donc probablement peu ou pas exprimé. Cette hypothèse est corrélée avec l'absence d'amplification en RT-PCR chez *R. x hybrida* 'H190', lorsque l'on utilise les amorces internes soupçonnées d'amplifier plusieurs allèles.

Ce travail complète celui de Spiller et al. (2010), dans lequel deux QTL, différents du nôtre, mais semblant expliquer des variations de quantité de 2-phényléthanol ont été cartographiés dans une population issue d'un croisement entre *R. multiflora* et un génotype non déterminé. L'un, est proche du gène *RhAADC* cloné par Sakai et al. (2007) et l'autre, du gène *RhAAT1* cloné par Guterman et al. (2002). Cependant, aucune étude de cause à effet n'a été entreprise dans ce travail. Dans notre cas, nous expliquons la présence de 2-phényléthanol par l'expression de l'allèle a1 du gène *RhPAAS*.

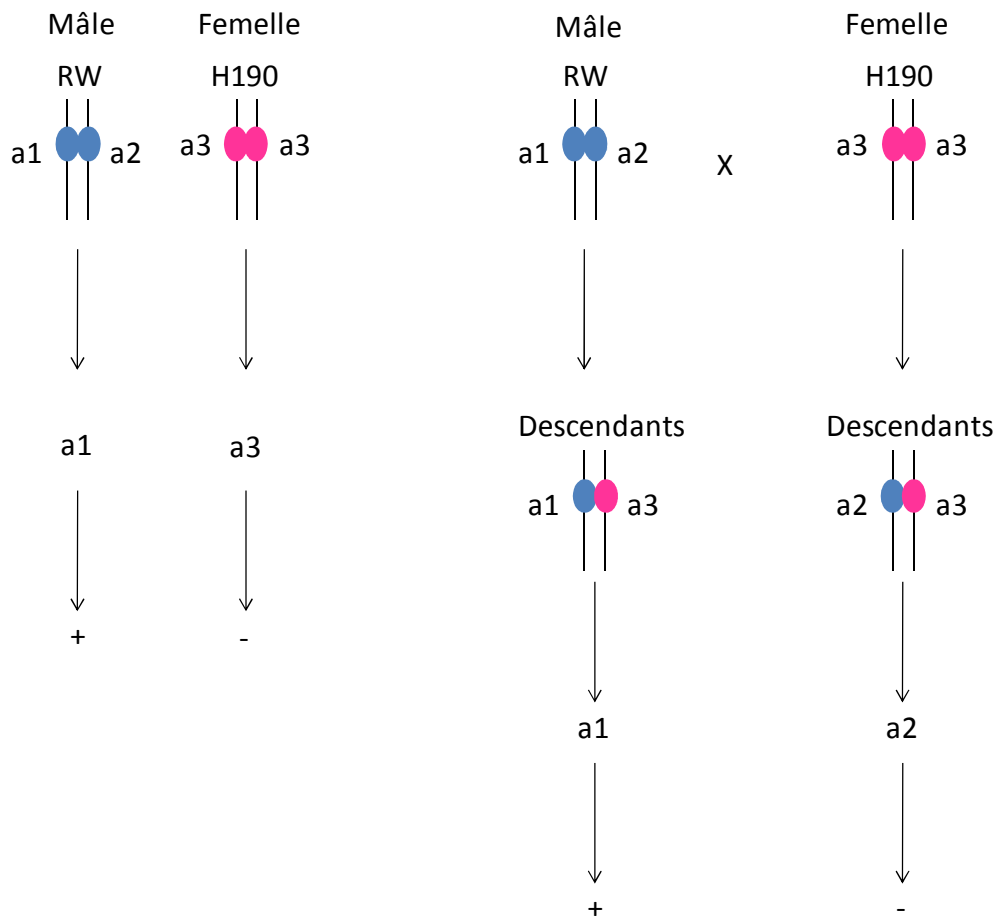


Figure 38 : schéma récapitulatif de l'expression des différents allèles exprimés chez les parents et les descendants. – représente les individus produisant peu de 2-phényléthanol et + correspond aux individus produisant beaucoup de 2-phényléthanol.

En conclusion de cette partie, nous avons trouvés tout d'abord les conditions pour lesquelles la quantité de 2-phényléthanol est maximale. Il s'agit des pétales au stade FE. Cependant, les résultats en PCR semi-quantitatives au stade FE ne se sont pas révélés concluantes. Ce n'est qu'au stade BJO avec les amorces UTR que la corrélation entre l'expression du gène *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol a été mise en évidence. Le 2-phényléthanol pourrait être produit sous forme glycosylée, non-volatile, au stade BJO et être émis au stade FE. Pour la première fois, nous avons mis en évidence que l'allèle *a1* est lié à la production de 2-phényléthanol tandis que l'allèle *a2* s'exprime uniquement chez les roses produisant très peu de 2-phényléthanol.

Discussion générale et perspectives

I. Modèle de sécrétion et/ou stockage des COV dans les pétales de roses

A. Localisation des enzymes de biosynthèse des COV

Notre travail a permis de compléter les recherches faites sur la localisation des enzymes de voie de biosynthèse des parfums. Grâce à notre protéome, deux enzymes ont été localisées dans les vésicules lipidiques de pétales de roses. Il s'agit tout d'abord d'une caroténoïde dioxygénase probablement impliquée dans la voie de biosynthèse de la β -ionone. Chez *Crocus sativus*, la même enzyme a été localisée dans les plastoglobules durant le développement des stigmates (Rubio et al., 2008). Notre fraction vésiculaire de pétales de roses étant constituée non seulement d'oléosomes mais aussi de plastoglobules, il est tout à fait probable que cette enzyme soit localisée dans le même compartiment cellulaire. Il s'agit ensuite d'une lipoxygénase située au début de la voie de biosynthèse des dérivés d'acides gras odorants. Cette enzyme a été localisée dans les oléosomes des graines de *Pimpinella anisum* (Radetzky et al., 1993) et des cotylédons de *Cucumis sativus* (Hause et al., 2000 ; Weichert et al., 2002). Là-aussi, cette localisation permet de penser que l'enzyme peut être dans le même compartiment cellulaire chez la rose. Il est intéressant de noter que, chez l'anis, la localisation de la lipoxygénase sur les oléosomes est transitoire atteignant son maximum au moment de la mobilisation des réserves. D'autres enzymes de la même voie, la 9-hydroxyperoxydase et la 9/13-hydroxyperoxydase, peuvent aussi être adressées aux oléosomes chez *Prunus dulcis* (Mita et al., 2005) et *Medicago truncatula* (De Domenico et al., 2007). Ces formes ne sont pas exclusives car des adressages aux plastes et au cytosol ont aussi été mis en évidence dans ces mêmes travaux alors que l'étude des séquences d'adressage ne permettait aucunement de prévoir ces localisations. Ces remarques sont importantes pour les perspectives expérimentales sur la caroténoïde 4-dioxygénase et la lipoxygénase de rose : tout travail d'immunolocalisation ou d'expression transitoire par fusion à la GFP devra être réalisé à

plusieurs stades de développement du pétale afin de ne pas rater le moment éventuel où elles pourraient rejoindre les oléosomes.

Nos résultats, quant à la localisation d'une caroténoïde dioxygénase et d'une lipoxygénase, sont aussi logiques du point de vue des sites de stockage des substrats : les caroténoïdes, substrats des caroténoïdes dioxygénases, sont clairement localisés dans les plastoglobules, et une partie des acides gras libres, substrats des lipoxygénases, sont aussi stockés dans les oléosomes en mélange avec les TG. Les enzymes sont donc simplement localisées à proximité de leur substrat. Il serait aussi possible que les produits (β -ionone et acides gras odorants) soient stockés ou transportés par les oléosomes vers la membrane plasmique après leur synthèse. Nous avons en effet localisé des acides gras odorants dans les fractions vésiculaires des variétés 'Caprice de Meilland' et 'Grégory Lemarchal'. Par contre nous n'avons pas localisé de β -ionone, mais celle-ci est toujours en faible concentration et difficilement détectable dans la plupart des extraits, même totaux.

B. Stockage des COV et en particulier du 2-phényléthanol

S'il est logique de trouver à la fois une lipoxygénase et des acides gras odorants dans les oléosomes, il l'est moins d'y localiser des COV sans les enzymes qui les synthétisent. C'est le cas des terpènes et des composés aromatiques pour lesquels aucune des enzymes de biosynthèse n'a été identifiée dans le protéome de la fraction vésiculaire. En ce qui concerne les terpènes, seuls des monoterpènes ont été retrouvés dans la fraction vésiculaire. Aucun des sesquiterpènes détectés dans les extraits totaux n'a été mis en évidence. Ce résultat est logique pour les sesquiterpènes faiblement concentrés mais illogique pour les sesquiterpènes à forte concentration comme le germacrène D chez la variété 'Grégory Lemarchal' et le farnésol chez les deux variétés étudiées. Ce résultat est d'autant plus surprenant que d'autres sesquiterpènes semblent être localisés dans des vésicules du réticulum du spadice d'une Aracée, *Sauromatum guttatum* (Skubatz et al., 1995) en mélange avec les autres familles de COV (Skubatz et al., 1996). Nous avons donc soit un problème technique dû à la difficulté d'extraire des COV par broyage et flottaison, soit une localisation différentielle des sesquiterpènes, chez la rose, et/ou à ce stade de développement. A l'opposé, plusieurs monoterpènes ont été retrouvés dans la fraction vésiculaire. C'est le cas du géraniol, détecté dans la fraction vésiculaire de la variété 'Caprice de Meilland' chez laquelle ce composé est majoritaire dans les extraits totaux. C'est aussi le cas de tous les monoterpènes en forte concentration dans les extraits totaux de cette

variété : nérol, citronellol et géraniol. La très forte lipophilie de ces composés explique qu'ils soient retrouvés dans la fraction vésiculaire. Il est malheureusement difficile de savoir s'ils y sont naturellement avant extraction ou s'ils s'y retrouvent par affinité après l'extraction. Néanmoins, nos colorations au Nile Red et au NaDi, colorant respectivement les TG et les terpènes, indiquent que toutes les cellules du pétale contiennent des oléosomes mais que seuls les épidermes contiennent des gouttelettes terpéniques. Ces deux populations de vésicules se retrouvent d'ailleurs lors de l'extraction. Nous savons par ailleurs chez la rose, que seuls les épidermes synthétisent des COV (Bergougnoux et al. 2007). Il est donc possible de proposer un modèle dans lequel les COV rejoindraient les oléosomes des cellules dans lesquels ils sont synthétisés, c'est-à-dire les cellules épidermiques (Figure 39). Dans une revue de synthèse, Guo et al. (2009) expliquent que les corps lipidiques des animaux pourraient avoir des rôles différents selon les organes et les tissus. Ces corps lipidiques étant structurellement identiques aux oléosomes des végétaux (corps de TG entouré d'une monocouche de phospholipides stabilisées par des protéines de structure), il est possible d'envisager qu'ils aient aussi plusieurs rôles, et en particulier un rôle de stockage des terpènes dans les tissus épidermiques des pétales.

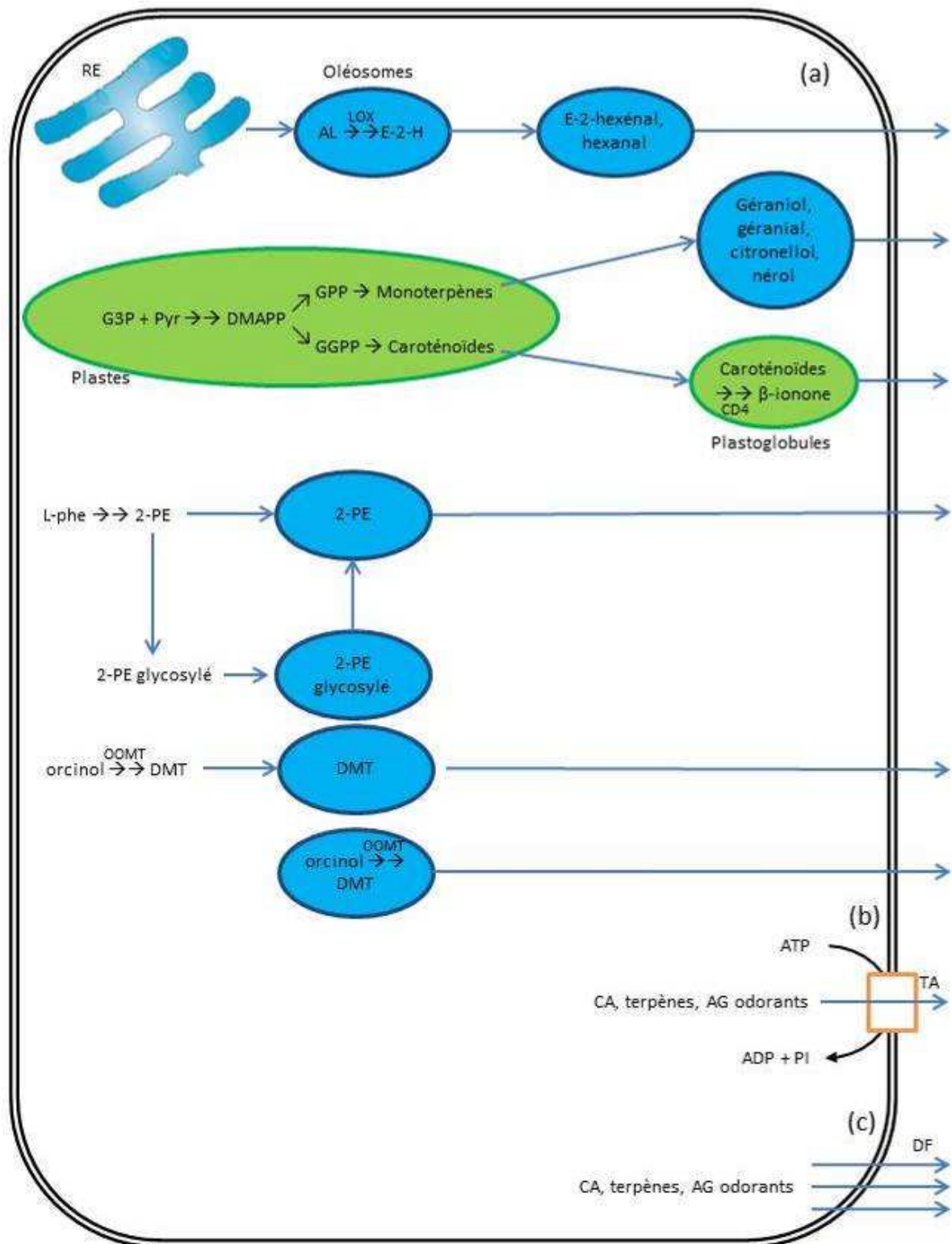


Figure 39 : schéma modèle de la biosynthèse, des possibilités de stockage et de transport des COV dans les cellules épidermiques des pétales de rose. AL : acide linoléique ; LOX : lipoxigénase ; E-2-H : E-2-hexénal ; L-phe : L-phénylalanine ; 2-PE : 2-phényléthanol ; TA : transport actif ; DF : diffusion passive ; CA : composés

aromatiques ; AG : acides gras ; GPP : géranyl diphosphate ; GGPP : géranylgéranyl diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; CD4 : caroténoïde 4-dioxygénase ; OOMT : orcino-O-méthyl transférase ; DMT : 3-5 diméthoxytoluène. Il y a trois possibilités de sécrétion. (a) Sécrétion granulocrine : les vésicules lipidiques (oléosomes, plastoglobules) pourraient stocker ou véhiculer les différentes catégories de COV. Ces vésicules contiendraient également les enzymes nécessaires à leur synthèse. (b) Transport actif : il serait envisageable que les COV soient excrétés par des transporteurs ABC. (c) : Diffusion passive : les COV passeraient à travers la membrane plasmique par diffusion passive.

Des composés aromatiques sont aussi retrouvés dans la fraction vésiculaire. Il s'agit du DMT chez la variété 'Caprice de Meilland' et du 2-phényléthanol chez la variété 'Grégory Lemarchal'. Dans les deux cas, il s'agit des composés aromatiques les plus abondants dans les extraits totaux. Ces composés sont moins lipophiles que les terpènes ou les acides gras odorants, il pourrait donc être surprenant de les retrouver dans cette fraction. Néanmoins, la localisation de l'enzyme de biosynthèse du DMT n'est pas complètement connue. Il s'agit d'une orcinol-O-méthyl transférase (OOMT) dont la localisation passe progressivement d'une fraction cytosolique à une fraction microsomale lors de l'épanouissement de la fleur alors qu'aucun peptide-signal ne laisse supposer un tel adressage (Scalliet et al. 2006). Nous avons séquencé cette OOMT dans notre protéome. Il est donc possible que l'enzyme de biosynthèse passe momentanément au contact des oléosomes et qu'une partie du DMT formé reste dans ce compartiment. En ce qui concerne le 2-phényléthanol, nous avons montré un décalage dans sa biosynthèse lors de l'épanouissement de la fleur. Le transcrit du gène *RhPAAS* est détecté avant l'ouverture de la fleur mais le 2-phényléthanol l'est bien plus tard. Ce composé semble être stocké durant la floraison. Dunphy (2006) a montré un stockage sous forme glycosylée. Nous pouvons envisager un stockage alternatif, sous une autre forme, dans les oléosomes comme il semble que ce soit le cas dans la variété 'Grégory Lemarchal'. Cette hypothèse peut être appuyée par les travaux de Strehle et al. (2005). Les auteurs localisent en effet de l'anethole, un phénylpropanoïde, dans des vésicules lipidiques de graines d'anis. Dans d'autres vésicules, du même type que celles contenant l'anethole, ils localisent des phospholipides. Leur technique d'imagerie est issue de la spectroscopie Raman. Nous avons déjà établi des liens avec cette équipe et nous envisageons de colocaliser des acides gras et des COV. La seule limite est celle de la résolution, leurs vésicules font plus de 10 μm alors que les nôtres font entre 1 et 2 μm . Une amélioration technique sera donc nécessaire. Quoiqu'il en soit, même s'il reste beaucoup d'incertitudes dans notre modèle, il semble bien que

certaines COV passent au moins transitoirement par les oléosomes. Hudak et Thompson (1997) et Hudak et al. (2000) ont déjà posé cette hypothèse après avoir détectés la plupart des familles de COV dans la fraction vésiculaire des pétales de *Dianthus caryophyllus*. La différence avec nos travaux est que d'un article à l'autre, ils ne confirment pas que cette fraction vésiculaire correspond bien à des oléosomes et préfèrent la nommer « lipid-protein particles ». Les auteurs précisent que ces « lipid-protein particles » ressemblent à des oléosomes mais proviennent d'un recyclage de la membrane plasmique. Ils y trouvent d'ailleurs le marqueur ATPase que nous avons aussi trouvé dans notre protéome. Par ailleurs, il est désormais établi chez les animaux que les corps lipidiques transportent des éléments membranaires (Guo et al., 2009) ; ce qui pourrait aussi être le cas des oléosomes, expliquant ainsi la présence d'une ATPase membranaire dans ce compartiment.

C. Mécanismes de sécrétion des COV

Si des COV passent par les oléosomes, les mécanismes qui les conduisent à l'extérieur des cellules sont encore totalement inconnus. Historiquement, toutes les hypothèses ont été formulées dans de nombreux articles présentant des planches de microscopie électronique : hypothèses eccrines avec transport direct au travers de la membrane plasmique avec ou sans ATP, hypothèses granulocrines avec exocytose ou expulsion des vésicules... Néanmoins, les travaux, qui cherchent à corréler des résultats de plusieurs observations, sont très rares.

L'étude du mécanisme d'émission du parfum des fleurs, étudié dans les pétales de *Petunia axillaris*, est basé sur la concentration endogène et la volatilité du benzaldéhyde, du méthylbenzoate et de l'iso-eugénol (Oyama-Okubo et al., 2005). Les auteurs montrent que le taux d'émission de chacun de ces COV oscille de façon synchrone avec la concentration endogène (Figure 9) mais qu'il existe une corrélation entre leur volatilité, déterminée par leur point d'ébullition et la rapidité de leur émission. Ils en déduisent que cette émission passe par une diffusion passive. Néanmoins cette corrélation n'est pas universelle puisque, par exemple, chez *Citrus medica*, l'abondance des COV émis par les pétales n'est pas en rapport avec la volatilité ; le limonène a un faible point d'ébullition et pourtant il est accumulé dans les tissus alors que le linalool, le plus abondamment émis, a un haut point d'ébullition (Altenburger et Matile, 1990). Chez une autre espèce, *Ribes nigrum*, Hansted et al. (1994) démontrent que l'augmentation de la température augmente l'émission des COV et donc que leur émission ne dépend pas uniquement du rythme de leur biosynthèse. Ils montrent aussi que sous photopériode et thermopériode continues, il existe tout de même un rythme, indiquant ainsi

qu'il y aurait une régulation circadienne de l'émission elle-même. Malgré les contradictions dûes à la difficulté de lier la volatilité d'un composé avec son émission, la diffusion passive reste une possibilité de transport des COV.

Une autre possibilité d'excretion des COV concerne l'exocytose. Dans les travaux sur *Sauromatum guttatum*, Skubatz et al. (1995) mettent en évidence un matériel osmiophile dans des vésicules du réticulum. Ce matériel est présent au moment de la biosynthèse et du stockage des COV mais disparaît le jour de l'émission des COV. La corrélation est parfaite et l'on distingue un grand nombre de vésicules se rapprochant de la membrane plasmique et se vidant du matériel osmiophile. Néanmoins, aucune véritable image d'exocytose n'est présentée. Dans des travaux complémentaires (Skubatz et al. 1996), ces auteurs observent des fusions directes entre le réticulum et la membrane plasmique, fusions qui créeraient des voies d'excrétion pas encore décrites. Ces observations amènent une réponse à une question récurrente dans les modèles d'exocytose : la fusion de la monocouche de phospholipides des oléosomes avec la bicouche du plasmalemma ne peut conduire qu'à une poche entre les deux feuilletts phospholipidiques, pas à une exocytose. Les résultats de Skubatz et al. (1995, 1996) et Skubatz et Kunkel (1999) semblent décrire une nouvelle modalité qu'il faudra probablement mieux comprendre et généraliser dans le futur.

II. Identification et rôle des oléosomes dans les pétales

A. Des oléosomes sans oléosines

Nous avons démontré l'existence d'oléosomes dans les pétales de rose par analyse des TG et par démonstration indirecte de la présence d'une monocouche de phospholipides. Ces oléosomes contiennent des protéines typiques mais aucune oléosine. Ce résultat est troublant mais doit être modéré par deux arguments. Tout d'abord, toutes les oléosines connues par séquençage du génome d'*A. thaliana*, sont des oléosines exprimées dans les tissus de réserves des graines, dans le tapetum des anthères ou dans les grains de pollen (Kim et al., 2002 ; Hsieh et Huang, 2005 ; Huang et al., 2009). Aucune oléosine n'a jamais été observée dans un autre tissu. Ensuite, dans des articles concernant d'autres espèces, il est précisé que les oléosomes des fruits ne portent pas d'oléosine (Ross et al., 1993). Des oléosomes de ce type ont aussi été décrits dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* (Walhroos et al., 2003). Il existe donc très probablement des oléosomes sans oléosine, et ceux des pétales ne sont qu'un

exemple supplémentaire, même s'il n'avait jamais été décrit. Récemment, un séquençage haut débit d'ADNc de rose a été réalisé par l'équipe « Rose » du laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes de Lyon et par le « Groupe National Rose ». Tous les organes étant représentés, il va devenir possible d'être plus exhaustif dans la recherche et l'étude des séquences d'oléosines chez les roses et de confirmer qu'aucun de ces gènes ne s'exprime dans les pétales.

B. Rôle des oléosomes dans le trafic des métabolites secondaires et des lipides

Dans notre protéome, une tubuline et une actine ont été séquencées. Ces protéines ont déjà été localisées dans les corps lipidiques des animaux (Fong et al., 2001 ; Brasaemle et al., 2004) et reliées au trafic cellulaire (Guo et al., 2009). Les corps lipidiques ont en effet des contacts avec tous les organites cellulaires comme par exemple les endosomes, les mitochondries, le réticulum, les peroxysomes et la membrane plasmique (Goodman, 2008 ; Murphy et al., 2008 ; Liu et al., 2007). Ces données laissent supposer que, chez la rose, les protéines du cytosquelette pourraient aussi contrôler le transport des oléosomes sur le réseau cytosquelettique. Cependant les fonctions de ces interactions sont très mal connues mais elles pourraient faciliter les échanges de lipides. Dans les pétales de rose, les oléosomes possèdent donc des protéines du cytosquelette qui leur permettraient de se déplacer et d'interagir avec d'autres organites. Une autre protéine identifiée, les pompes H⁺-ATPase localisées sur la membrane plasmique, sont un témoin du trafic cellulaire des oléosomes. Les vésicules lipidiques interagiraient donc avec la membrane comme nous en avons déjà discuté.

Hsieh et Huang (2007) se sont intéressés aux transports des flavonoïdes qui sont des métabolites secondaires non volatils faisant partie de la grande famille des composés aromatiques comme les phénylpropanoïdes. Chez *Brassica napus*, la localisation in-situ des flavonoïdes dans les anthères révèle leur présence exclusivement dans le réticulum et dans les tapétosomes. Les enzymes permettant leurs synthèses y sont aussi localisées. Après la synthèse des flavonoïdes qui se déroulent du côté du cytosolique du réticulum, ils seraient transportés jusqu'aux tapétosomes par des transporteurs membranaires. Pour le confirmer, un mutant d'*A. thaliana* défectueux pour un transporteur membranaire a été étudié. Chez celui-ci, les flavonoïdes ne s'accumulent plus dans les tapétosomes mais restent dans le cytosol (Hsieh et Huang, 2007). Un autre exemple est fourni par les très nombreux articles sur le cholestérol, un triterpène non volatil. Celui-ci est synthétisé dans le réticulum, stocké en partie sur les

oléosomes et excrété par des transporteurs ABC (Ikonen, 2006). Il est tout à fait possible d'imaginer un modèle avec un stockage de métabolites secondaires par les oléosomes et une excrétion cellulaire par des transporteurs ABC.

Les transporteurs ABC sont des transporteurs actifs qui utilisent de l'ATP. Ils sont situés sur différents compartiments cellulaires et peuvent transporter une multitude de produits dont des métabolites secondaires, comme des flavonoïdes (Goodman et al., 2004) et des terpènes (Jasinski et al., 2001). Dans ce dernier travail, le gène NpABC1 a été cloné chez *Nicotiana plumbaginifolia* et il code pour un transporteur ABC, localisé dans la membrane plasmique. Dans les feuilles, la présence du sclaréol, un diterpène toxique mais non volatil, augmente l'expression du transporteur entraînant l'excrétion du sclaréol à l'extérieur des cellules. Une étude de cette famille de transporteurs pourrait être extrêmement intéressante chez la rose, même si ces transporteurs sont connus pour être très pléiotropes. Nous pourrions imaginer de les exprimer dans des levures qui produisent naturellement des COV, comme le 2-phényléthanol par exemple, et mesurer la vitesse de sécrétion avec ou sans transporteur.

C. Rôle des oléosomes dans la sénescence et dans la dégradation des protéines

Un autre rôle peut être déduit après étude du protéome de ces oléosomes de pétales. Plusieurs protéines du stress et du protéasome ont été identifiées dans les vésicules lipidiques des roses. Toutes ces protéines laissent à penser que les vésicules lipidiques seraient en contact avec le protéasome. L'ubiquitine, marqueur des protéines à dégrader via le protéasome, en est un bon exemple. Identifiée dans notre fraction vésiculaire, elle a déjà été mise en évidence dans les corps lipidiques des hépatocytes animaux (Ohsaki et al., 2006). En effet, les apolipoprotéine B, leur forme ubiquitinilée et la sous-unité 26S du protéasome ont été détectées par « Western-blot ». En microscopie, ces apolipoprotéines B ubiquitinilées ont été retrouvées autour des corps lipidiques. Ceci pourrait être transposé chez la rose. Les oléosomes auraient un rôle de transporter des protéines ubiquitinilées vers le protéasome. Un autre point important, ayant un lien avec le protéasome, est la présence des protéines du stress telles que les différentes HSP et la BiP2 dans les oléosomes de pétales de rose. Là-aussi, ces protéines ont déjà été localisées dans des corps lipidiques d'animaux (Prattes et al., 2000 ; Wan et al., 2007). Par leur présence, les protéines mal conformées seraient isolées dans ce compartiment cellulaire. Les vésicules lipidiques aideraient à la dégradation de protéines mal repliées, en les transportant jusqu'au protéasome. Comme nous l'avons souligné précédemment, les vésicules

lipidiques seraient impliquées dans le trafic cellulaire, et elles pourraient également interagir avec le protéasome. Ces résultats ouvrent un champ de recherche novateur sur la sénescence des pétales même si le lien avec la biosynthèse et la sécrétion des COV n'est pas évident.

III. Relations entre les allèles du gène *RhPAAS*

Notre travail a permis de mettre en évidence que l'allèle a1 du gène *RhPAAS* est lié à la production de 2-phényléthanol tandis que l'allèle a2 s'exprime uniquement chez les roses produisant peu de 2-phényléthanol. A l'opposé, l'allèle a3 ne s'exprime que très peu, quel que soit le contexte allélique. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence de phénotype.

L'étude de la quantité des transcrits de chaque génotype nous donne un aperçu de la corrélation entre l'expression de *RhPAAS* et la production de 2-phényléthanol. Ainsi, chez *R. x hybrida* 'H190', de génotype a3/a3, une faible quantité de transcrits a3 est observée et chez les descendants a1/a3 et a2/a3, aucun transcrit a3 n'est noté. Nous pouvons en déduire que a3 est un allèle faiblement exprimé. Un séquençage complet des UTR et du promoteur nous donnera peut-être les mutations responsables de cette faible expression. Par contre, chez *R. wichuraiana*, de génotype a1/a2, une grande quantité de 2-phényléthanol et de transcrit a1 sont observées, mais pas de transcrit a2. A l'opposé, chez les descendants a2/a3, nous trouvons très peu de 2-phényléthanol, pas de transcrit a3, mais une grande quantité de transcrits a2. Face à ces résultats, deux aspects peuvent être étudiés.

Si l'allèle a2 n'est pas traduit, il y a une régulation post-transcriptionnelle, sinon l'enzyme n'est pas fonctionnelle. Pour s'orienter vers une des deux explications, il faudrait produire la protéine dans un vecteur d'expression, fabriquer des anticorps et tester ces lignées de rose par « Western-blot ». Si un doute subsiste sur une bande, il est toujours possible de prélever la bande d'électrophorèse et de séquencer les peptides pour confirmer qu'il s'agit bien de la protéine a2.

Y a-t-il une relation épigénétique entre allèles, relation qui modulerait l'expression de a2 ? La réponse à cette question semble être positive puisque en présence de a1, le transcrit a2 n'est pas détecté, mais en présence de a3, on en décèle une grande quantité. Par contre, la nature de cette relation épigénétique est inconnue mais pourrait ressembler à des paramutations.

La paramutation implique des interactions entre les allèles homologues et amène à une régulation transcriptionnelle différente pour ces allèles (Chandler, 2007 ; Stam, 2009). Un

article illustre le rôle des marqueurs épigénétiques régulant le locus b1 dans des tissus spécifiques du maïs, *Zea mays* (Haring et al., 2010). Le locus b1 code pour un facteur de transcription qui active la voie de la pigmentation des anthocyanes. Deux allèles notés B' et B-1 ont une séquence génomique identique mais un niveau transcriptionnel de 10 à 20 fois plus élevé pour B-1, indiquant qu'il s'agit d'épi-allèles. Cette différence d'expression peut être expliquée tout d'abord par le recrutement de différents histones et par la méthylation de l'ADN. Il est admis que la méthylation est impliquée dans la maintenance du « silencing » au moment de la mitose et de la méiose (Jaenisch et Bird, 2003). Les histones acétylés et diméthylés sont associés à l'amélioration et l'activation des gènes transcrits (Heintzman et al., 2007) alors que les histones H3K9 méthylés et H3K27 diméthylés et triméthylés sont liés à la répression transcriptionnelle (Klose et Bird, 2006 ; Zhang et al., 2007). B' et B-1 portent, en amont du codon « start », une région régulatrice contenant sept motifs répétés en tandem jouant un rôle important dans la régulation épigénétique de ces deux allèles. Dans les tissus de la plante adulte, une faible expression de B' est associée à un fort niveau de méthylation au niveau de l'ADN, plus particulièrement au niveau des sept motifs répétés en tandem, contrairement à B-1 qui montre une faible méthylation dans ce motif alors qu'il existe une forte expression de celui-ci. La méthylation est marquée spécifiquement à la jonction des motifs répétés au niveau d'une cytosine. Ce mécanisme souligne donc l'inactivation de l'expression de l'allèle B-1. De plus, le maintien d'un faible niveau d'expression est expliqué par le recrutement de H3K9 et H3K27 méthylés au niveau de l'ADN pour l'allèle B' alors que le haut niveau d'expression est expliqué par le recrutement des histones acétylés pour l'allèle B-1. Nos résultats d'amplification de *RhPAAS* avec les amorces UTR montrent que l'allèle a2 n'est jamais exprimé chez le parent femelle et les descendants produisant peu ou pas de 2-phényléthanol. On pourrait donc émettre l'hypothèse que la région UTR ou le promoteur lui-même de l'allèle a2 soit méthylé ce qui conduirait à une absence d'expression de ce gène ou encore que le recrutement des histones empêcherait la transcription de celui-ci. Au laboratoire, une seconde thèse sur l'étude de ces allèles a démarré cette année.

Une dernière remarque peut être faite pour compléter nos perspectives. La voie de biosynthèse du 2-phényléthanol se déroule en deux étapes. Dans mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à la première étape dans laquelle *RhPAAS* catalyse la phénylalanine en 2-phénylacétaldéhyde. Pour compléter notre travail, il serait envisageable d'étudier la deuxième enzyme, la phénylacétaldéhyde réductase, dont le gène a été cloné chez *Lycopersicon esculentum* (Tieman et al., 2006) et vient d'être cloné chez la rose (Chen et al.,

2010). Chez la tomate, la phénylacétaldéhyde, faiblement accumulée dans les tissus, est rapidement métabolisée en 2-phényléthanol par une action de réductase/deshydrogénase. Chez les tomates surexprimant la phénylacétaldéhyde réductase, la quantité de 2-phényléthanol n'augmente pas, indiquant que cette enzyme n'est pas limitante pour la synthèse du 2-phényléthanol.

IV. Conclusion générale

En conclusion, nous avons démontré pour la première fois la présence d'oléosomes dans des pétales. Nous avons amené des éléments expérimentaux en faveur d'un stockage des COV dans les oléosomes. Ce stockage pourrait être très momentané et ne pas concerner tous les COV. Quoi qu'il en soit, il est désormais possible d'imaginer des modèles dans lesquels l'émission de chaque COV serait régulée non seulement par son rythme de biosynthèse mais aussi par son rythme de stockage/déstockage. Ces hypothèses ouvrent de nouvelles perspectives de recherche. Nous avons aussi démontré que la quantité de 2-phényléthanol émise par certaines variétés de roses dépendait d'interactions alléliques complexes. Ce travail ouvre deux thèmes très complémentaires de recherche : un premier sur l'histoire du gène *RhPAAS* durant la domestication des roses et un second sur l'origine botanique naturelle et écologique de la diversité de ces allèles.

Références bibliographiques

A

Ackerman I.E., Bonthorpe V., Fordham W.D., Kinder J.P. et Poots I. -1989- β -glucosides of aroma components from petals of Rosa species : assay, occurrence and biosynthetic implications - *Journal of Plant Physiology*, **134** : 567-572

Altenburger R. et Matile P. -1990- Further observations on rhythmic emission of fragrance in flowers - *Planta* **180** : 194-197

Anderson L.E. et Pacold I. -1972- Chloroplast and cytoplasmic enzymes. IV Pea leaf D-fructose-1,6-biphosphate aldolases - *Plant Physiology*, **49** : 393-397

Arai Y., Hayashi M. et Nishimura M. -2008- Proteomic analysis of highly purified peroxisomes from etiolated soybean cotyledons - *Plant and Cell Physiology*, **49** : 526-539

Athenstaedt K., Zweytick D., Jandrositz A., Kohlwein S.D. et Daum G. -1999- Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* – *Journal of Bacteriology*, 6441-6448

B

Batoko H., Zheng H.-Q., Hawes C. et Moore I. -2000- A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants - *The Plant Cell*, **12** : 2201-2217

Beisson F. -1999- Etude des oléosomes de plantes et de leur lipolyse. Méthodes de dosage de l'activité des lipases - *Thèse de l'université de la méditerranée*, 154

Bergounoux V., Caissard J.C., Jullien F., Magnard J.L., Scalliet G., Mark Cock J., Hugueney P. et Baudino S. -2007- Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds – *Planta*, **226** : 853-866

Blom T.J. et Tsujita M.J. -2003- Cut rose Production. In Encyclopedia of Rose Science, 2, Robert S. A., Debener T et Gudin S., Ed., Elsevier Scientific Press, Oxford, 594-600

Boatright J., Negre F., Chen X., Kish C.M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D. and Dudareva N. -2004- Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue - *Plant Physiology*, **135** : 1993-2011

Brasaemle D.L., Dolios G., Shapiro L. et Wang R. -2004- Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes - *The Journal of Biological Chemistry*, **279** : 46835-46842

Brickell C. et Mioulaine P. -2002- Le rosier. Encyclopédie universelle des 15 000 plantes et fleurs de jardin - Ed. Larousse-Bordas, Paris, 980-985

C

Caldas H et Herman GE., -2003- NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets - *Human Molecular Genetics*, **12** : 2981-2991

Cavallo D., Rudy D., Mohammadi A., Macri J. et Adeli K. -1999- Studies on degradative mechanisms mediating post-translational fragmentation apolipoprotein B and the generation of 70-kDa fragment- *The Journal of Biological Chemistry*, **274** : 23135-23143

Chandler V.L. -2007- Paramutation: from maize to mice- *Cell*, **128** : 641–645

Channelière S., Rivière S., Scalliet G., Szecsi J., Jullien F., Dolle C., Vergne P., Dumas C., Bendahmane M., Hugueney P. et Cock J.M. -2002- Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags - *FEBS Letters*, **515** : 35-38

Chen E.C.F., Lin R.-H, Huang H.-C et Tzen J.T.C. -1997- Cloning expression and isoform classification of a minor oleosin in sesame oil bodies - *The Journal of Biochemistry.*, **122** : 819-824

Chen E.C.F, Tai S.SK, Peng C.-C et Tzen J.T.C. -1998- Identification of three novel unique proteins in seed oil bodies of sesame - *Plant and Cell Physiology.*, **39** : 935-941

Chen H.C., Klein A., Xiang M., Backhaus R.A. et Kuntz M. -1998- Drought- and Wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein - *The Plant Journal.*, **14** : 317-326

Chen J.C.F et Tzen J.T.C. -2001- An *in vitro* system to examine the effective phospholipids and structural domain for protein targeting to seed oil bodies - *Plant and Cell Physiology*, **42** : 1245-1252

Chen X.-M. , Kobayashi H., Sakai M., Hirata H., Asai T., Ohnishi T., Baldermann S. et Watanabe N.-2010- Functional characterization of rose phenylacetaldehyde reductase (PAR), an enzyme involved in the biosynthesis of the scent compound 2-phenylethanol - *Journal of Plant Physiology*, **167**

Clark G. S. -1990- Phenylethyl alcohol - *Perfumer Flavorist*, **15** : 37-44

Cooper L.L.D., Oliver J.E., De Vilbiss E.D. et Doss R.P. -2000- Lipid composition of the extracellular matrix of *Botrytis cinerea* germings - *Phytochemistry*, **53** : 293-298

Crespel L., Chirollet M., Durel C.E., Zhang D., Meynet J. et Gudin S. -2002- Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers – *Theoretical and Applied Genetics*, **105** : 1207-1214

D

David R. et Carde J.P. – 1964 – Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif NaDi - *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **258** : 1338-1340

Debener T. et Mattiesch L. -1999- Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and ALFP markers - *Theoretical and Applied Genetics*, **99** : 891-899

De Domenico S., Tsesmetzis N., Di Sansebastiano G.P., Hughes R.K., Casey R. et Santino A. - 2007- Subcellular localisation of *Medicago truncatula* 9/13-hydroperoxide lyase reveals a new localisation pattern and activation mechanism for CYP74C enzymes - *BMC Plant Biology*, **7** : 58-71

Delbard H. -2002- Evolution du marché des rosiers de jardin et des fleurs coupées – Colloque “Les roses aujourd’hui et demain” - *Jardins de France*, **4** : 27-29

deOliviera D.E., Franco L.O., Simoens C., Seurinck J., Coppieters J., Botterman J. et Van Montagu M. -1993- Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycin-rich proteins - *The Plant Journal*, **3** : 495-507

Deruère J., Römer S., d’Harlingue A., Backhaus R.A., Kuntz M. et Camara B. -1994- Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts : a model for supramolecular lipoprotein structures – *The Plant cell*, **6** : 119

- Dexter R.J., Verdonk J.C., Underwood B.A., Shibuya K., Schmeltz E.A. et Clark D.G.** -2008- Tissue-specific *PhBPBT* expression is differentially regulated in response to endogenous ethylene - *Journal of experimental botany*, **59** : 609-618
- Dickinson J.R., Salgado L.E.J. et Hewlins M.J.E.** -2003- The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278** : 8028-8034
- Dirlewanger E., Moing A., Etienne P., Cosson P., Poizat C., Denoyes-Rothan B., Faurobert M., Audergon J.M., Lambert P., Arus P. et Laigret C.** -2002- Apport des études de synthénie : comparaison des génomes chez les rosacées fruitières. 12^{ème} colloque sur les recherches fruitières. Bordeaux
- Dobson H.E.M., Bergström G. et Groth I.** -1990- Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae) - *Israel Journal of Botany*, **39** : 143-156
- Dobson, H. E. M., Danielson, E. M. et van Wesep I.D.** -1999- Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae) - *Plant Species Biology*, **14** : 153-166
- Dudareva N., Raguso R.A., Wang J., Ross J.R. et Pichersky E.** -1998- Floral Scent Production in *Clarkia breweri*. III. Enzymatic Synthesis and Emission of Benzenoid Esters - *Plant Physiology*, **116** : 599-604
- Dugo M.L., Satovic Z., Millán T., Cubero J.I., Rubiales D., Cabrera A. et Torres A.M.** -2005- Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses - *Theoretical and Applied Genetics*, **111** : 511-520
- Dunphy P.J.** -2006- Localisation and biosynthesis of monoterpenyl fatty acyl esters in rose petals - *Phytochemistry*, **67** : 1110-1119
- Dyer J.M., Stymne S., Green A.G. et Carlsson A.S.** -2008- High-value oils from plants - *The Plant Journal*, **54** : 640-655

E

Esau K. -1965- Plant anatomy – J. Wiley and sons eds, New York, 767

F

Fahn A. -2000- Structure and function of secretory cells – *Advances in Botanical Research*, **31** : 37-97

Farhi M., Lavie O., Masci T., Hendel-Rahmanim K., Weiss D., Abeliovich H. et Vainstein A. -2010- Identification of rose phenylacetaldehyde synthase by functional complementation in yeast - *Plant Molecular Biology*, **72** : 235-245

Feussner I., Wasternack C., Kindl H. et Kühn H. -1995- Lipxygenase-catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92** : 11849-11853

Feussner I., Balkenhohl T.J., Porzel A., Kühn H. et Wasternack C. -1997- Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. Implication of lipid body lipxygenase in lipid mobilization during germination - *The Journal of Biological Chemistry*, **272** : 21635-21641

Fisher E.A., Zhou M., Mitchell D.M., Wu X., Omura S., Wang H., Goldberg A.L. et Ginsberg H.N. -1997- The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70- *The Journal of Biological Chemistry*, **272** : 20427-20434

Fong T.-H., Wu C.-H., Liao E.-W., Chang C.-Y., Pai M.-H., Chiou R.-J. et Lee A.-W. -2001- Association of globular β -actin with intracellular lipid droplets in rat adrenocortical cells and adipocytes - *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **289** : 1168-1174

Frandsen G.I., Müller-Uris F., Nielsen M., Mundy J. et Skriver K. -1996- Novel plant Ca^{2+} -binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress - *The Journal of Biological Chemistry*, **271** : 343-348

Franke W.W., Hergt M. et Grund C. -1983- Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion : formation of an intermediate filament cage around lipid globules - *Cell*, **49** : 131-141

Froese C.D, Nowack L., Cholewa E. et Thomson J.E. -2003- Molecular composition and surface properties of storage lipid particles in wax bean (*Phaseolus vulgaris*) - *Journal of Plant Physiology*, **160** : 215-225

G

Galvez S., Roche O, Bismuth E., Brown S., Gadai P. et Hodges M. -1998- Mitochondrial localization of a NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95** : 7813-7818

Gardner H.W. -1991- Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants - *Biochimica et Biophysica Acta*, **1084** : 221-239

Gasperini C. et Pupillo P. -1983- Aldolase isoenzymes of maize leaves - *Plant Science Letters*, **28** : 163-171

Goodman C.D., Casati P. et Walbot V. -2004- A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays* - *The Plant Cell*. **16** : 1812-1826

Goodman J.M. -2008- The Gregarious Lipid Droplet. - *The journal of biological chemistry*, **283** : 28005–28009

Goossens A., Häkkinen S.T., Laakso I., Oksman-Caldentey K-M. et Inzé D. -2003- Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures - *Plant Physiology*, **131** : 1161-1164

Grattapaglia D. et Sederoff R. -1994- Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers - *Genetics*, **137** : 1121-1137

Greenberg A.S., Egan J.J., Wek S.A., Garty N.B., Blanchette-Mackie E.J. et Londos C. -1991- Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. - *The Journal of Biology Chemistry*, **266** : 11341-11346

Greenberg A.S., Egan J.J., Wek S.A., Moos M.C., Londos C. et Kimmel A.R. -1993- Isolation of cDNAs for perilipins A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90** : 12035-12039

Gudin S. -1995- Rose improvement, a breeder's experience - *Acta horticulturae*, **420** : 125-128

Gudin S. et Mouchotte J. -1996- Integrated research in rose improvement. A breeder's experience - *Acta horticulturae*, **424** : 285-292

Gudin S. -2000- Rose : genetics and breeding - *Plant Breeding Reviews*, **17** : 159-189

Guo Y., Cordes K.R., Farese R.V. et Walther T.C. -2009- Lipid Droplets at a glance- *Journal of Cell Science*, **122** : 749-752

Guterman I., Shalit M., Menda N., Piestun D., Dafny-Yelin M., Shalev G., Bar E., Davydov O., Ovadis M., Emanuel M., Wang J., Adam Z., Pichersky E., Lewinsohn E., Zamir D., Vainstein A. et Weiss D. -2002- Rose scent : genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes - *The Plant Cell*, **14** : 2325-2338

Guterman I., Masci T., Chen X., Negre F., Pichersky E., Dudareva N., Weiss D. et Vainstein A. -2006- Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants : rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers. - *Plant Molecular Biology*, **60** : 555-563

H

Haas I.G. -1994- BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum - *Experientia*, **50** : 1012-1020

Hall T.A. -1999- BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows

Hammerson F. -1985- Histology : Color Atlas of Microscopic Anatomy, 2^{ème} édition, Urban et Schwarzenberg, Baltimore

Hansted L., Jakobsen H.B. et Olsen C.E. - 1994- Influence of temperature on the rhythmic emission of volatiles from *Ribes nigrum* flowers *in situ* - *Plant, Cell and Environment*, **17** : 1069-1072

Hardie W.J., Aggenbach S.J. et Jaudzems V.G. -1996- The plastids of the grape pericarp and their significance in isoprenoid biosynthesis - *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2** : 144-154

- Haring M., Bader R., Louwers M., Schwabe A., Driel R.V. et Stam M.** -2010- The role of DNA methylation, nucleosome occupancy and histone modifications in paramutation - *The Plant Journal*, **63** : 366-378
- Hause B., Weichert H., Höhne M., Kindl H. et Feussner I.** -2000- Expression of cucumber lipid-body lipoxygenase in transgenic tobacco : lipid-body lipoxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies - *Planta*, **210** : 708-714
- Hayashi S., Yagi K., Ishikawa M., Asai T., Picone J., Turnbull C., Hiratake J., Sakata K., Takada M., Ogawa K. et Watanabe N.** -2004- Emission of 2-phenylethanol from its β -D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [$^2\text{H}_8$]L-phenylalanine in rose flowers - *Tetrahedron*, **60** : 7005-7013
- Heintzman N.D., Stuart R.K., Hon G., Fu Y., Ching C.W., Hawkins R.D., Barrera L.O., Calcar S.V., Qu C., Ching K.A., Wang W., Weng Z., Green R.D., Crawford G.E. et Ren B** -2007- Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome - *Nature Genetics*, **39** : 311-318
- Helsper J.P.F.G., Davies J.A., Bouwmeester H.J., Krol A.F. et Van Kampen M.H.** -1998- Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty - *Planta*, **207** : 88-95
- Hendel-Rahman K., Masci T., Vainstein A. et Weiss D.** -2007- Diurnal regulation of scent emission in rose flowers - *Planta*, **226** : 1491-1499
- Hennig J., Malamy J., Gryniewicz G., Indulski J et Klessig DF** -1993- Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco - *The Plant Journal*, **4** : 593-600
- Hernandez-Pinzon I., Patel K. et Murphy D.J.** -2001- The *Brassica napus* calcium-binding protein, caleosin, has distinct endoplasmic reticulum- and lipid body-associated isoforms - *Plant Physiology and Biochemistry*, **39** : 615-622
- Hibrand-Saint Oyant L., Crespel L., Rajapaske S., Zhang L. et Foucher F.** -2008- Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits - *Tree Genetics and Genomes*, **4** : 11-23
- Hsieh K. et Huang A.H.C.** -2005- Lipid-rich tapetosomes in *Brassica* tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum - *The Plant Journal*, **43** : 889-899

Hsieh K. et Huang A.H.C. -2007- Tapetosomes in *Brassica* tapetum accumulate endoplasmic reticulum derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface - *The Plant Cell*, **19** : 582-596

Huang A.H.C. -1992- Oil bodies and oleosins in seed. - *Physiology Plant Molecular Biology*, **43** : 177-200

Huang A.H.C. -1996- Oleosins and oil bodies in seeds and other organs - *Plant Physiology*, **110** : 1055-1061

Huang C.Y, Chung C.I., Lin Y.C., Hsing Y.I.C. et Huang A.H.C -2009- Oil bodies and oleosins in *Physcomitrella* possess characteristics representative of early trends in evolution – American Society of Plant Biologists - *Plant Physiology*, **150** : 1192-1203

Hudak K.A. et Thompson. J.E. -1996- Flotation of lipid-protein particles containing triacylglycerol and phospholipid from the cytosol of carnation petals - *Physiologia Plantarum*, **98** : 810-818

Hudak K.A. et Thompson J.E. -1997- Subcellular localization of secondary lipid metabolites including fragrance volatiles in carnation petals - *Plant Physiology*, **114** : 705-713

Hudak K.A., Madey E., Hong Y., Su L. et Thompson. J.E. -2000- Immunopurification of H⁺-ATPase-containing lipid-protein particles from the cytosol of carnation petals - *Physiologia Plantarum*, **109** : 304-312

I

IKonen E. -2006- Mechanisms for cellular cholesterol transport : defects and human disease - *Physiological Reviews*, **86** : 1237-1261

J

Jaenisch R. et Bird A. -2003- Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals - *Nature Genetics*, **33** : 245-254

Jakobsen H.B. et Christensen L.P. -2002- Diurnal changes in the concentrations of 2-phenylethyl β -D-glucopyranoside and the corresponding volatile aglycone in the tissue and headspace of *Trifolium repens* L. Florets - *Plant Cell and Environment*, **25** : 773-781

- Jasinski M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J. et Boutry M. -** 2001- A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion - *The Plant Cell*, **13** : 1095-1107
- Jedd G., et Chua N.H. -**2002- Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals actomyosin dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding - *Plant and Cell Physiology*, **43** : 384-392
- Jiang H., He J., Pu S., Tang C. et Xu G. -**2007- Heat shock protein 70 is translocated to lipid droplets in rat adipocytes upon heat stimulation - *Biochimica and biophysica Acta*, **1771** : 66-74
- Jirovetz L., Buchbauer G., and Shahabi M. -**2002- Comparative investigations of essential oils and their SPME headspace volatiles of *Rosa damascena* from Bulgaria and *Rosa centifolia* from Morocco using GC-FID, GC-MS and olfactometry - *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **5** : 111-121
- Joichi A., Yomogida K., Awano K.I. et Ueda Y. -**2005- Volatile components of teascented modern roses and ancient Chinese roses - *Flavour and Fragrance Journal*, **20** : 152-157
- Jolivet P., Roux E., D'Andrea S., Davanture M., Negroni L., Zivy M. et Chardot T.-** 2004- Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS - *Plant Physiology and Biochemistry*, **42** : 501-509

K

- Kalinski A., Loer D.S., Weisemann J.M., Matthews B.F. et Herman E.M. -**1991- Isoforms of soybean seed oil body membrane protein 24 kDa oleosin are encoded by closely related cDNAs - *Plant Molecular Biology*, **17** : 1095-1098
- Kaminaga Y., Schnepf J., Peel G., Kish C.M., Ben-Nissan G., Weiss D., Orlova I., Lavie O., Rhodes D., Wood K., Porterfield D.M., Cooper A.J.L., Schloss J.V., Pichersky E., Vainstein A. et Dudareva N. -**2006- Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyses phenylalanine decarboxylation and oxidation - *The Journal of Biological chemistry*, **281** : 23357-23366

- Kanczewska J., Marco S., Vandermeeren C., Maudoux O., Rigaud J.L. et Boutry M.** -2005- Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer - *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **102** : 11675-11680
- Katavic V., Agrawal G.K., Hajduch M., Harris S.L. et Thelen J.J.** -2006- Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars - *Proteomics*, **6** : 4586-98
- Keddie J.S., Hübner G., Slocombe S.P., Jarvis R.P., Cummins I., Edwards E.-W., Shaw C.H. et Murphy D.J.** -1992- Cloning and characterization of an oleosin gene from *Brassica napus* - *Plant Molecular Biology*, **19** : 443-453
- Kessler F., Schnell D. et Blobel G.** -1999- Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts - *Planta*, **208** : 107-113
- Kim H.U., Hsieh K., Ratnayake C. et Huang A.H.C.** -2002- Expression of *Arabidopsis* oleosin genes and characterization of their encoded oleosins. A novel group of oleosins is present inside the pollen of *Arabidopsis* - *The Journal of Biological Chemistry*, **277** : 22677-22684
- Klose R.J. et Bird A.P.** -2006- Genomic DNA methylation: the mark and its mediators - *Trends in Biochemical Sciences*, **31** : 89–97
- Knudsen J.T. et Tollsten L.** -1993- Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes floral scent composition in moth-pollinated taxa - *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113** : 263-284
- Knudsen J.T., Tollsten L. et Bergström L.G.** -1993- Floral scents - a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques - *Phytochemistry*, **33** : 253-280
- Kopito R.R.** -2000- Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation - *Trends in Cell Biology*, **10** : 524-530
- Kuerschner L., Moessinger C. et Thiele C.** -2008- Imaging of lipid biosynthesis : how a neutral lipid enters lipid droplets - *Traffic*, **9** : 338-352

L

- Lacey M.L. et Haimo L.T.** -1993- Cytoplasmic dynein binds to phospholipid vesicles - *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **28** : 205-212

- Laizet Y., Pontier D., March R. et Kuntz M.** -2004- Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid-lipid-associated proteins of the fibrillin type – *Journal of genome Science and Technology*, **3** : 19-28
- Lavid N., Wang J., Shalit M., Guterman I., Bar E., Beuerle T., Menda N., Shafir S., Zamir D., Adam Z., Vainstein A., Weiss D., Pichersky E. et Lewinsohn E.** -2002- Omethyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals - *Plant Physiology*, **129** : 1899-1907
- Leber R., Landl K., Zinser E., Ahorn H., Spök A., Kohlwein S.D., Turnowsky F et Daum G.** -1998- Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles - *Molecular Biology of the Cell*, **9** : 375-386
- Lebherz H.G., Leadbetter M.M. et Bradshaw R.A.** -1984- Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast form of spinach leaf fructose diphosphate aldolase - *The Journal of Biological Chemistry*, **259** : 1011-1017
- Leclercq-Perlat M.N., Corrieu G. et Spinnler H.E.** -2004- Comparaison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxinus* - *Journal of Dairy Science*, **87** : 1545-1550
- Lin Y.H. et Huang A.H.C.** -1984- Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings - *Plant Physiology*, **76** : 719-722
- Lin L.J., Tai S.S.K., Peng C.C. et Tzen J.T.C.** -2002- Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies - *Plant Physiology*, **128** : 1200-1211
- Liu P, Bartz R., Zehmer J.K., Ying Y.S., Zhu M., Serrero G. et Anderson R.G.** -2007- Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets - *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773** : 784-793
- Loughrin J., Hamilton-Kemp T.R., Burton H.R., Anderson R.A. et Hildebrand D.F.** - 1992- Glycosidically bound volatile components of *Nicotiana sylvestris* and *N.suaveolens* flowers - *Phytochemistry*, **31** : 1537-1540

M

- Maia N. et Vénard P.** -1976- Cytotaxonomie du genre *Rosa* et origine des rosiers cultivés - *Travaux sur le rosier de serre*, 7-20
- Malek B.V., Weber W.E. et Debener T.** -2000- Identification of molecular markers linked to Rdr1, a gene conferring resistance to blackspot in roses - *Theoretical and Applied Genetics*, **101** : 977-983
- Martin D.M., Toub O., Chiang A., Lo B.C., Ohse S., Lund S.T. et Bohlmann J.** -2009- The bouquet of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) flowers arises from the biosynthesis of sesquiterpene volatiles in pollen grains - *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, **106** : 7245-7250
- Matsui K., Hijiya K., Tabuchi Y. et Kajiwarra T.** -1999- Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies - *Plant Physiology*, **119** : 1279-1287
- Mc Gookey D.J. et Anderson R.G.** -1983- Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells - *The Journal of Cell Biology*, **97** : 1156-1168
- Milla P., Athenstaedt K., Viola F., Oliaro-Bosso S., Kohlwein S.D., Daum G. et Balliano G.** -2002- Yeast oxidosqualene cyclase (Erg7p) is a major component of lipid particles - *The Journal of Biological Chemistry*, **277** : 2406-2412
- Meynet J., Barrade R., Duclos A. et Siadous R.** -1994- Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrida* cv Sonia) obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and in vitro culture of immature seeds – *Agronomie*, **2** : 169-175
- Meynet J.** -2001- Les rosiers cultivés, une très longue histoire d’exploitation de labiodiversité seulement pour le plaisir et l’art de vivre - *Dossier de l’environnement de l’INRA*, **21** : 113-118
- Millichip M., Tatham A.S., Jackson F., Griffiths G., Shewry P.R. et Stobart A.K.** -1996- Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oilbody boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) - *Biochemical Journal*, **314** : 333-337

Mita G., Quarta A., Fanaso P., De Paolis A., Di Sansebastino G.P., Perrotta C., Iannacone R., Belfield E., Hughes R., Tsesmetzis N., Casey R. et Santino A. -2005- Molecular cloning and characterization of a 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies – *Journal of Experimental Botany*, **56** : 2321-2333

Moyal Ben Zvi M., Negre-Zakharov F., Masci T., Ovadis M., Shklarman E., Ben-Meir H., Tzfira T., Dudareva N. et Vainstein A. -2008- Interlinking showy traits : co-engineering of scent and color biosynthesis in flowers - *Plant Biotechnology Journal*, **6** : 403-415

Murphy D.J. et Cummins I. -1989- Seed oil bodies : isolation, composition and role of oil body apolipoproteins - *Phytochemistry*, **28** : 2063-2069

Murphy D.J. -1990- Storage lipid bodies in plants and other organisms – *Progress in Lipid Research*, **29** : 299-324

Murphy D.J. et Vance J. -1999- Mechanisms of lipid-body formation - *Trends in Biochemical Sciences*, **24** : 109-115

Murphy D.J., Hernandez-Pinson I., Patel K., Hope R.G. et McLauchlan J. -2000- New insights into the mechanisms of lipid-body biogenesis in plants and other organisms - *Biochemical Society Transactions*, **28** : 710-711

Murphy D.J. -2001- The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and Microorganisms - *Progress in Lipid Research*, **40** : 325-438

Murphy S., Martin S. et Parton R.G. -2009- Lipid droplet-organelle interactions ; sharing the fats - *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cellular Biology of Lipids*, **1791** : 441-447

N

Naested H., Frandsen G.I., Jauh G.-Y., Hernandez-Pinson I., Nielsen H.B., Murphy D.J., Rogers J.C. et Mundy J. -2000- Caleosins : Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies - *Plant Molecular Biology*, **44** : 463-476

Nakamura S. -1987- Scent and component analysis of the hybrid tea rose - *Perfumer & Flavorist*, **12** : 43-45

Nakamura N., Banno Y. et Tamiya-Koizumi K. -2005- Arf1-dependent PLD1 is localized to oleic acid-induced lipid droplets in NIH3T3 cells - *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **335** : 117-123

O

Ohloff G. et Demole E. -1987- Importance of the odoriferous principle of Bulgarian rose oil in flavor and fragrance chemistry - *Journal of Chromatography*, **406** : 181-183

Ohsaki Y., Cheng J., Fujita A., Tokumoto T. et Fujimoto T. -2006- Cytoplasmic Lipid Droplets Are Sites of Convergence of Proteasomal and Autophagic Degradation of Apolipoprotein B - *Molecular Biology of the Cell*, **17** : 2674-2683

Oka N., Ohishi H., Hatano T., Hornberger M., Sakata K. et Watanabe N. -1999- Aroma evolution during flower opening in *Rosa damascena* Mill. - *Zeitschrift für Naturforschung Teil C*, **54** : 1-7

Olofsson S.O., Asp L. et Boren J. -1999- The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins - *Current Opinion in Lipidology*, **10** : 341-346

Oyama-Okubo N., Ando T., Watanabe N., Marchesi E., Uchida K. et Nakayama M. - 2005- Emission mechanism of floral scent in *Petunia axillaris* – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **69** : 773-777

Özel M.Z. et Clifford, A.A. -2004- Superheated water extraction of fragrance compounds from *Rosa canina* - *Flavour and Fragrance Journal*, **19** : 354-359

P

Pan M., Liang J.S., Fisher E.A. et Ginsberg H.N. -2002- The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis - *The Journal Biological of Chemistry*, **277** : 4413-4421

Plaxton W.C. -1996- The organization and regulation of plant glycolysis - *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47** : 185-214

Poxleitner M., Rogers S.W., Samuels A.L., Browse J. et Rogers J.C. -2006- A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination - *The Plant Journal*, **47** : 917-933

Prattes S., Hörl G., Hammer A., Blaschitz A., Graier W.F., Sattler W., Zechner R. et Steyrer E. -2000- Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes : triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures - *Journal of Cell Science*, **113** : 2977-2989

R

Radetzky R., Feussner I., Theimer R.R. et Kimdl H. -1993- Transient occurrence of lipoxygenase and glycoprotein gp49 in lipid bodies during fat mobilization in anise seedlings - *Planta*, **191** : 166-172

Rajapaske S., Byrne D.H., Zhang L., Anderson N., Arumuganathan K. et Ballard R.E. -2001- Two genetic linkage maps of tetraploid roses - *Theoretical Applied Genetics*, **103** : 575-583

Reuveni M., Sagi Z., Evnor D. et Hetzroni A. -1999- β -glucosidase activity is involved in scent production in Narcissus flowers - *Plant Science*, **147** : 19-24

Rey P., Gillet B., Römer S., Eymery F., Massimino J., Peltier G. et Kuntz M. -2000- Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress - *The Plant Journal*, **21** : 483

Riou C., Salmon J.M., Vallier M.-J., Günata Z. et Barre P. -1998- Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* - *Applied and Environmental Microbiology*, **64** : 3607-3614

Rodrigo M.P., Siloto M.P., Findlay K., Lopez-Villalobos A., Yeung E.C., Nykiforuk C.L. et Moloney M.M. -2006- The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis - *Plant Cell*, **18** : 1961-1974

Robert L.S., Gerster J., Allard S., Cass L. et Simmonds J. -1994- Molecular characterization of two *Brassica napus* genes related to oleosins which are highly expressed in the tapetum - *The Plant Journal*, **6** : 927-933

Roistch T. et González M.C. -2004- Function and regulation of plant invertases : sweet sensations - *Trends in plant science*, **9** : 606-613

Ross J.H.E., Sanchez J., Millan F. et Murphy D.J. -1993- Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*) - *Plant Science*, **93** : 203-210

Ross J.H.E et Murphy D.J. -1996- Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae - *The Plant Journal*, **9** : 625-637

Rubio A., Rambla J.L., Santaella M., Gomez M.D., Orzaez D. Granell A et Gomez-Gomez L. -2008- Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenase from *Crocus sativus* are both involved in β -ionone release – *Journal of biological chemistry*, **283** : 24816-24825

S

Sakai M., Hirata H., Sayama H., Sekiguchi K., Itano H., Asai T., Dohra H., Hara M. et Watanabe N. -2007- Production of 2-phenylethanol in roses as the dominant floral scent compound from the L-phenylalanine by two key enzymes, a PLP-dependent decarboxylase and a phenylacetaldehyde reductase - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71** : 2409-2419

Sakai M., Tomita S., Hirata H., Asai T., Dohra H., Hara M. et Watanabe N. -2008- Purification and characterization of the β -glucosidase involved in the emission of the 2-phenylethanol from rose flowers - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **72** : 219-221

Scalliet G., Journot N., Jullien F., Baudino S., Magnard J.-L., Channelière S., Vergne P., Dumas C., Bendahmane M., Cock J. M. et Hugueney P. -2002- Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxytoluene by novel rose O-methyltransferases - *FEBS Letters*, **523** : 113-118

Scalliet G., Lionnet C., Le Behec M., Dutron L., Magnard J.-L., Baudino S., Bergougnoux V., Julien F., Chambrier P., Vergne P., Dumas C., Cock J. M. et Hugueney P. -2006- Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent - *Plant Physiology*, **140** : 18-29

Scalliet G., Piola F., Douady C.J., Réty S., Raymond O., Baudino S., Bordji K., Bendahmane M., Dumas C., Cock J.M. et Hugueney P. -2008- Scent evolution in Chinese roses - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** : 5927-5932

Schade F., Legge R.L. et Thompson J.E. -2001- Fragrance volatiles of developing and senescing carnation flowers - *Phytochemistry*, **56** : 703-710

- Schmidt M.A. et Herman E.M.** -2008- Suppression of soybean oleosin produces micro oil bodies that aggregate into oil body/ER complexes - *Molecular Plant*, **1** : 910-924
- Schulz H.** -2003- Odoriferous substances and pigments. In : Roberts, A., Debener, T., Gudin, S. (eds.) : *Encyclopedia of Rose Science*. Academic Press, London, 231-240
- Schwab W., Aharoni A., Raab T., Garcia Pérez A. et Sanz C.** -2001- Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) - *Phytochemistry*, **56** : 407-415
- Shalit M., Guterman I., Volpin H., Bar E., Tamari T., Menda N., Adam Z., Zamir D., Vainstein A., Weiss D., Pichersky E. et Lewinsohn E.** -2003- Volatiles ester formation in roses. Identification of an acetyl-Coenzyme A geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals - *Plant Physiology*, **131** : 1868-1876
- Shalit M., Shafir S., Larkov O., Bar E., Kaslassi D., Adam Z., Zamir D., Vainstein A., Weiss D., Ravid U. et Lewinsohn E.** -2004- Volatile compounds emitted by rose cultivars : fragrance perception by man and honeybees - *Israel Journal of Plant Sciences*, **52** : 245-255
- Skubatz H., Kunkel D. D., Patt J. M., Howald W. N., Hartman T. G. et Meeuse B. J. D.** -1995- Pathway of terpene excretion by the appendix of *Sauromatum guttatum* - *Proceedings of National Academy of Science*, **92** : 10084-10088
- Skubatz H., Kunkel D.D., Howald W.N, Trenkle R. et Mookherjee B.** -1996- The *Sauromatum guttatum* appendix as an osmophore : excretory pathways, composition of volatiles and attractiveness to insects - *New Phytologist*, **134** : 631-640
- Skubatz H. et Kunkel D.D.** -1999- Further studies of the glandular tissue of the *Sauromatum guttatum* (Araceae) appendix - *American Journal of Botany*, **86** : 841-854
- Slack C.R., Bertaud W.S., Shaw B.D., Holland R., Browse J. et Wright H.** -1980- Some studies on the composition and surface properties of oil bodies from the seed cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) and linseed (*Linum usitatissimum*) - *Biochemical Journal*, **190** : 551-561
- Smirnova E., Goldberg E.B., Makarova K.S., Lin L., Brown W.J. et Jackson C.L.** -2006- ATLGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells - *European Molecular Biology Organization reports*, **7** : 106-113
- Spiller M., Berger R.G. et Debener T.** -2010- Genetic dissection of the scent metabolic profiles in diploid rose populations - *Theoretical and Applied Genetics*, **120** : 1461-1471

Spiller M., Linde M., Hibrand-Saint Oyant L., Tsai C-J, Byrne D.H., Smulders, Foucher F. et Debener T. -2010- Towards o unified genetic map for diploid roses- *Theoretical and Applied Genetics*, **10**

Stam M. -2009- Paramutation: a heritable change in gene expression by allelic interactions in trans- *Molecular Plant*, **2** : 578–588

Stanley R.G. et Linskens H.F. -1974- Pollen : biology, biochemistry, management - *Springer*

Strehle M.A., Rösch P., Baranska M., Schulz H. et Popp J. -2005- On the way to a quality control of the essential oil of fennel by means of Raman spectroscopy. - *Biopolymers*, 44-52

Stubbs J.M. et Francis M.J.O. -1971- Electron microscopical studies of rose petal cells during flower maturation - *Planta Medica*, **20** : 211-218

Stukkens Y., Bultreys A., Grec S., Trombik T., Vanham D. et Boutry M. -2005- NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense - *Plant Physiology*, **139** : 341-352

Suire C., Bouvier F., Backhaus R. A., Bégu D., Bonneau M. et Camara B. -2000- Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a new role of oil bodies - *Plant Physiology*, **124** : 971-978

Szponarski W., Sommener N., Boyer J.C., Rossignol M. et Gibrat R. -2004- Large-scale characterization of integral proteins from *Arabidopsis* vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography - *Proteomics*, **4** : 397-406

T

Taiz L. et Zeiger E. -1998- *Plant physiology*, 2nd edn, Sinauer Associates, Sunderland, Mass

Testu C. -1984- Roses anciennes - Ed. Flammarion, Paris, 247

Tevini M. et Steinmuller D. -1985- Composition and function of plastoglobuli. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech senescence - *Planta*, **163** : 91-96

Tieman D., Taylor M., Schauer N., Fernie A.R., Hanson A.D. et Klee H.J. -2006- Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde - *Proceedings of National Academy of Sciences*, **103** : 8287-8292

Toida J., Arikawa Y., Kondou K., Fukuzawa M. et Sekiguchi J. -1998- Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae* - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **62** : 759-763

Tzen J.T.C., Lai Y.K., Chan K.L. et Huang A.H.C. -1990- Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species - *Plant Physiology*, **94** : 1282-1289

U

Untergasser A. et Nijveen H. -2007- Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 - *Nucleic Acids Research*, **35** : 71-74

V

Van de Pol P.A., Schiet F.T. et Frijters J.E.R. -1986- A preliminary investigation of odor change in cut and intact roses in various stages of maturation - *Acta horticultura*, **189** : 215-220

Vance V.B. et Huang A.H.C. -1987- The major protein from lipid bodies of maize. Characterization and structure based on cDNA cloning - *The Journal of Biological Chemistry*, **262** : 11275-11279

Vassilyev A.E. -2000- Quantitative ultrastructural data of secretory duct epithelial cells in *Rhus toxicodendron* - *International Journal of Plant Science*, **161** : 615-63

Veenhuis M., Sulter G., Van Der Klei I. et Harder W. -1989- Evidence for functional heterogeneity among microbodies in yeasts – *Archives of Microbiology*, **151** : 105-110

Verdonk J.C., Haring M.A., Van Tunen A.J. et Schuurink R.C. -2005- ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers - *Plant Cell*, **17** : 1612-1624

Vuralhan Z., Morais M.A., Tai S.L., Piper M.D.W. et Pronk J.T. -2003- Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae* - *Applied and Environmental Microbiology*, 4534-4541

Y

Yan Z., Denneboom C., Hattendorf A., Dolstra O., Debener T., Stam P. et Visser P.B. - 2005- Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers - *Theoretical Applied Genetics*, **110** : 766-777

Yatsu L.Y., Jacks T.J. et Hensarling T.P. -1971- Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage, and cottonseed tissues - *Plant Physiology*, **48** : 675-682

Yatsu L.Y. et Jacks T.J. -1972- Spherosome membranes. Half unit-membranes - *Plant Physiology*, **49** : 937-943

W

Wahlroos T., Soukka J., Denesyuk A., Wahlroos R., Korpela T. et Kilby N.J. -2003- Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells - *Genesis The Journal of Genetics and development*, **35** : 125-132

Wan H.-C., Melo R.C.N., Jin Z., Dvorak A.M. et Weller P.F. -2007- Roles and origins of leukocyte lipid bodies : proteomic and ultrastructural studies - *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **21** : 167-178

Wanner G. et Theimer R.R. -1978- Membranous appendices of spherosomes (Oleosomes). Possible role in fat utilization in germinating oil seeds - *Planta*, **140** : 163-169

Watanabe S., Hashimoto I., Hayashi K., Yagi K., Asai T., Knapp H., Straubinger M., Winterhalter P. et Watanabe N. -2001- Isolation and identification of 2-phenylethyl disaccharide glycosides and mono glycosides from rose flowers, and their potential role in scent formation – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **65** : 442-445

Watanabe S., Hayashi K., Yagi K., Asai T., MacTavish H., Picone J., Turnbull C. et Watanabe N. -2002- Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers : incorporation of [²H₈]L-phenylalanine into 2-phenylethanol and its β-D-glucopyranoside during the flower opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **66** : 943-947

Weather P.R., Burkiott H.G. et Daniels V.G. -1987- Functional Histology : A Text and Colour Atlas, 2^{ème} édition, Churchill Livingstone, New York

Weichert H., Kolbe A., Kraus A., Wasternack C. et Feussner I. -2002- Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings-lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes- *Planta*, **215** : 612-619

Weiss E. A. -1997- Rosaceae – In : Essential oil crops. CAB International (ed.), 393-416

Welte, M.A. -2007- Proteins under new management lipid droplets deliver – *Trends in Cell Biology*, **17** : 363-369

Wolinski H. et Kohlwein S.D. -2008- Microscopic analysis of lipid droplet metabolism and dynamics in yeast - *Methods in Molecular Biology*, **457** : 151-63

Wu C.C., Howell K.E. et Neville M.C. -2000- The endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells - *Electrophoresis*, **21** : 3470-3482

Wu C.C., Mac Coss M.J., Mardones G., Finnigan C., Mogelsvang S., Yates J.R. et Howell K.E. -2004- Organellar proteomics reveals golgi arginine dimethylation - *Molecular Biology Cell*, **15** : 2907-2919

Wu S., Watanabe N., Mita S., Dohra H., Ueda Y., Shibuya M. et Ebizuka Y. -2004- The key role of phloroglucinol-O-methyltransferase in the biosynthesis of *Rosa chinensis* volatile 1,3,5-trimethoxybenzene - *Plant Physiology*, **135** : 95-102

Wu S.S.H., Platt K.A., Ratnayake C., Wang T.W., Ting J.T.L. et Huang A.H.C. -1997- Isolation and characterization of novel neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from the *Brassica napus* tapetum - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94** : 12711-12716

X

Xu G., Sztalryd C., Lu X., Tansey J.T., Gan J., Dorward H., Kimmel A.R. et Londos C. - 2005- Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway - *The Journal Of Biological Chemistry*, **280** : 42841-42847

Z

Zhang X., Clarenz O., Cokus S., Bernatavichute Y.V., Pellegrini M., Goodrich J. et Jacobsen S.E. -2007- Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis* - *PLoS Biology*, **5** : 129

Zinser E., Sperka-Gottlieb C.D.M., Fasch E.-V., Kohl Wein S.D. Paltauf F. et Daum G. -1991- Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* - *The Journal of Bacteriology*, **173** : 2026-2034

Zinser E. et Daum G. -1995- Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* - *Yeast*, **11** : 493-536

Annexes

Annexe 1 Cartes génétiques et marqueurs moléculaires

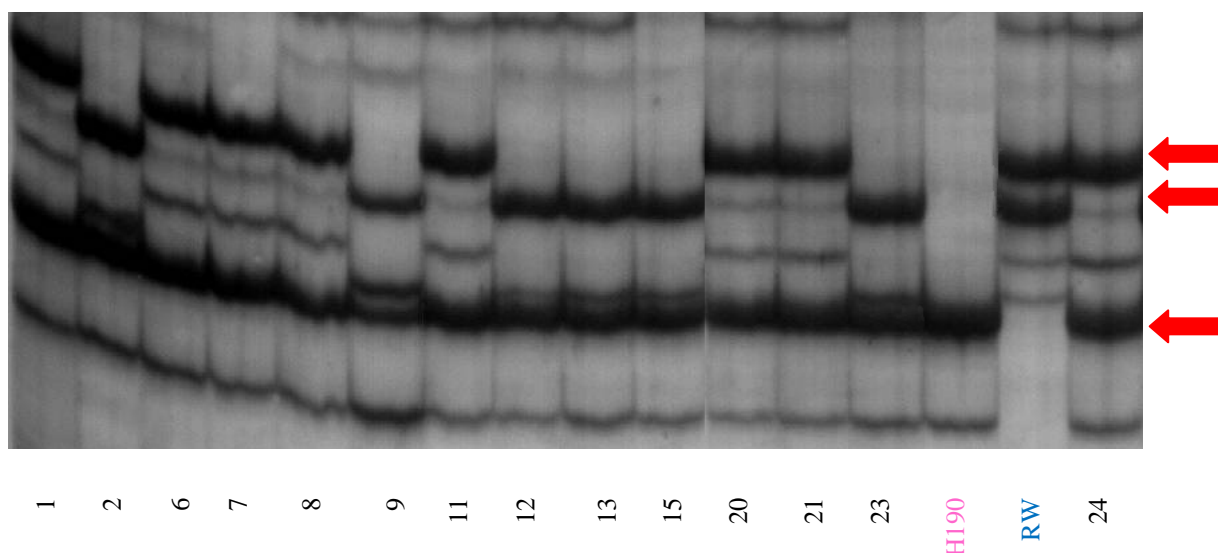


Figure 40 : polymorphisme en SSCP du gène *RhPAAS* (d'après D. Lalanne de l'UMR GenHort, non publié). Des amorces ont été dessinées à partir de la séquence clonée de *R. x hybrida* 'Fragrant Cloud' (Kaminaga et al., 2006 ; numéro d'accèsion DQ 192639). Une bande représente le monobrin d'un allèle. Les flèches de couleur rouge indiquent les différents allèles obtenus : a, b et c. Les numéros sont les noms des descendants ; H190 et RW correspondent aux parents *R. x hybrida* 'H190' et *R. wichuraiana*.

Tableau 22 : Comparaison entre le 2-phényléthanol extrait des pétales et les génotypes de *RhPAAS* observés après analyse du gel sur la population HW (d'après S. Baudino et D. Lalanne, non publié). Les extraits sont analysés en CPG-SM et CPG-FID et les résultats représentent la moyenne de la quantité du 2-phényléthanol produit, exprimée pA*s, obtenus sur deux années consécutives. L'écart-type du 2-phényléthanol produit représente l'erreur standard.

Individus	Moyenne	Ecart-type	Génotype
Rw	540,2	190,6	ab
H190	2,6	0,8	cc
9	5,4	0,4	bc
12	0,8	0,7	
13	5,9	0,3	
15	4,6	2,3	
23	0,4	0,0	
25	0,6	0,2	
27	2,9	0,1	
28	4,2	1,0	
33	2,9	0,5	
37	1,1	0,2	
38	0,6	0,0	
39	6,8	1,2	
44	5,9	0,1	
57	4,8	0,7	
61	3,1	1,5	
64	1,5	0,3	
67	3,1	0,8	
68	1,4	0,3	
73	2,8	0,3	
74	4,2	2,2	
77	1,8	0,5	
83	2,1	1,2	
86	0,3	0,0	
91	0,7	0,5	
92	0,0	0,0	
96	0,8	0,1	
98	1,2	0,3	
102	2,5	0,5	
103	0,3	0,0	
112	0,3	0,0	
126	1,6	0,7	
137	2,1	1,2	
142	1,9	0,2	
145	3,3	0,4	
148	4,8	0,7	
149	3,3	0,7	
167	0,3	0,5	
237	4,7	2,1	
248	2,2	1,1	
51	6,2	0,9	
1	523,7	43,4	ac
6	711,7	205,3	
7	770,8	58,1	
8	286,2	40,7	
11	384,4	77,5	
17	1148,5	883,9	
20	634,0	77,7	
21	206,7	115,2	
24	941,0	441,6	
26	253,6	36,7	

Individus	Moyenne	Ecart-type	Génotype
35	669,8	46,9	
50	1509,2	489,0	
56	439,4	96,2	
69	2011,9	152,8	
70	2320,0	69,6	
71	824,4	13,0	
88	458,8	27,5	
97	396,5	95,4	
100	670,7	76,7	
105	534,3	157,9	
121	649,0	50,8	
128	1020,0	149,4	
129	124,0	0,0	
133	322,7	31,6	
140	567,6	22,8	
146	442,1	53,7	
150	728,5	17,2	
220	180,2	23,0	
306	654,0	16,1	
336	847,6	245,0	
351	376,9	18,6	
373	464,8	23,6	
376	441,9	77,3	
401	103,0	0,0	
530	487,4	88,7	
707	707,9	92,1	

Annexe 2 Solutions pour isoler des vésicules lipidiques par gradient de saccharose

Solution à 0,4 M

Tampon HEPES-NaOH pH 7,5	0,05 M
Saccharose	0,4 M
Na ₂ EDTA	0,1 M

Solution à 0,2 M

Tampon HEPES-NaOH pH 7,5	0,05 M
Saccharose	0,2 M
Na ₂ EDTA	0,1 M

Annexe 3 Solutions utilisées pour l'expression transitoire

Milieu LB (Luria Bertani medium)

Sodium Chloride	10 g/L
Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
pH	7

Milieu LB (Luria Bertani medium) agar

Sodium Chloride	10 g/L
Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
pH	7
Agar	

Composition du tampon d'infiltration utilisé lors de la transformation transitoire par *Agrobacterium tumefaciens*

MES NaOH pH 5,6	50 mM
NaH ₂ PO ₄	2 mM
Glucose	0,5 %
Acétosyringone (3,5 diméthoxy 4-hydroxy acétophénone)	200 µM

Antibiotiques

		Souche 35S-GFP	Souche oléo1-GFP	Souche P19
Antibiotiques en mg/L	Gentamicine	20	20	20
	Kanamycine	50	50	20
	Rifampicine	50	50	0

Annexe 4 Solutions de biologie moléculaire

Tampon DNase RQ1 10X

Tris-HCl pH 8	400 mM
MgSO ₄	100 mM
CaCl ₂	10 mM

Tampon M-MLV Reverse Transcriptase 5X

Tris-HCl pH 8,3	50 mM
KCl	75 mM
MgCl ₂	3 mM
DTT	10 mM

Tampon ADN polymérase Gotaq® 5X

KCl	250 mM
MgCl ₂	7,5 mM
Tris-HCl pH 9	50 mM

TAE 1X

Tris-acétate pH 7,6	40 mM
EDTA pH 8	1 mM

Tampon de ligation 10X (ligase ADN T4)

Tris-HCl pH 7,3	300 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	10 mM

Milieu SOC

Tryptone	2 %
Extrait de levure	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	2 mM
Glucose	20 mM

Annexe 5 Séquences nucléiques et nucléotidiques de *RhPAAS*

RhPAAS (Kaminaga et al., 2006)

Les couples d'amorces internes sont appelés PAAS-S1 et PAAS-AS1 (vert) et PAAS-S2 et PAAS-AS2 (jaune). Le couple d'amorce UTR est nommé PAAS-S4 et PAAS-AS4 (bleu). Les codons start et stop sont surlignés en rose.

	10	20	30	40	50	60	70	80
RhPAAS	ATCGATCTGTCTTTCTAGCCTTT	ATTGATCATCTGTTGTATCACCTAGCTGTGTTCAACTAATTCACTTCCAATCTAAAT						M
	90	100	110	120	130	140	150	160
RhPAAS	GGTAGCTTCCCATTCACAG	GGATCTACAAGAGATCGCCTCTTCCCACTGACCAAAGCCCTAGACCCGAAGAGTTCA						
	G S F P F H R D L Q E I A S S Q L T K A L D P E E F							
	170	180	190	200	210	220	230	240
RhPAAS	GGAAACAAGGCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTACTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCTAAGCCGAGTT							
	R K Q G H M V I N F I A D Y Y Q N I E K Y P V L S R V							

250 260 270 280 290 300 310 320
 RhPAAS
 GAACCAGGGTATTTGAAAAATGCCTACCAAGTGTGAGCCCCATATGACCCCTGAACCCATCTCAACCATCCTTAGAGATGT
 E P G Y L K K C L P V S A P Y D P E P I S T I L R D V

330 340 350 360 370 380 390 400
 RhPAAS
 TCAGAATCACATTGTTCTGGCCTAACACATTGGCAAAGTCCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTG
 Q N H I V P G L T H W Q S P N F F A Y F S S T A S T

410 420 430 440 450 460 470 480
 RhPAAS
 CTGGATTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGGTTCAACTGGGTTCATCACCAGCAGCAACCGAG
 A G F L G E I L T T G F N V V G F N W V S S P A A T E

490 500 510 520 530 540 550 560
 RhPAAS
 CTCGAAAACATAGTCATGGATTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCAATGGCGGCGG
 L E N I V M D W L G D M L Q L P K S F H F S G N G G G

570 580 590 600 610 620 630 640
 RhPAAS
 TGTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTGCACAATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACCCGAATTGGTA
 V L H G S T C E A I V C T M V A A R D Q M L R R I G

650 660 670 680 690 700 710 720
 RhPAAS
 GCGAGAATTTGGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTCAGACCAAACACATAGCACACTTCAAAAAGCTACCCAAATTGTTGGA
 S E N L G K L V V Y G S D Q T H S T L Q K A T Q I V G

730 740 750 760 770 780 790 800
 RhPAAS
 ATCAACACGGGAGAACTTCCGGGCCATCAAGACTACAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGAC
 I N T E N F R A I K T T K S T G F A L S P E M L R L T

810 820 830 840 850 860 870 880
 RhPAAS
 AATAAGTTCCGACCTGGAAAAAGGTCTAGTGGCGCTCTTTCTTGTGCCACAATTGGCACAACCGCCACCCTGCTATTG
 I S S D L E K G L V P L F L C A T I G T T A T T A I

890 900 910 920 930 940 950 960
 RhPAAS
 ATCCATTGGAGGCACTATGTCATGTAGCAAAAGAATACGGCGTGTGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGCTGGAAGTGCC
 D P L E A L C H V A K E Y G V W V H V D A A Y A G S A

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 RhPAAS
 TGCATTGTCCAGAATTTCCGCATTTTATTAACGGCGTAGAGGGCGCAAATTTCTTTAGTTTCAACCCCATAGTGGTT
 C I C P E F R H F I N G V E G A N S F S F N P H K W L

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 RhPAAS
 ATTCACTGGAATGGATTGCTGTGCTTTGGGTTAAGAAATCCAAGTGTGTGGCAAGTTCACGTGCGACGAATCCGGAGT
 F T G M D C C C L W V K N P S V L A S S L S T N P E

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 RhPAAS
 TTTTGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGAGGTTTCGG
 F L R N K A S D S K Q V V D Y K D W Q I A L S R R F R

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 RhPAAS
 GCATTGAAGCTGTGGCTTGTGCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAGAACTTTATTCGTATCCATGTCAAATGGC
 A L K L W L V L R S Y G V A N L R N F I R I H V K M A

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 RhPAAS
 CAAGACTTTTGAAGGGCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAAGATTCTGGTGCCTAGAACTTCTCCTTGGTCTGCTTTA
 K T F E G L V R M D K R F E I L V P R N F S L V C F

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 RhPAAS
 GAATTTCAACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGATGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATTGCTG
 R I S P S A L I S S N E D D E I G M V N E V N C K L L

```

      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
RhPAAS  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAGGCCATCAATGCATCAGGTAAAGCATACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTACGTGCTTCGTTGCGCGGTTGG
E A I N A S G K A Y M T H A V V G G L Y V L R C A V G

      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
RhPAAS  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGCAACTCTGACCGAGGAAAAGCACATAGTCGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCAATCCTCAGCACGT
A T L T E E K H I V E A W N V V Q D H A Q A I L S T

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
RhPAAS  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATTGATAATAAGTAAACTACTTGTACTACGTACCATGGAAATAAAGAATATCTGTGTGTGGTAATAGTCGAAACAGTTA
Y * * * V K L L V L R T M E I K N I C V W * * S K Q L

      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
RhPAAS  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GTTTCGGTTTGGAATGCCTTCAATCTCTGTGCTGGTTATTGGATTAAATAATATATCCACGGTCTGAATTGAATATTTAAAA
V S V W N A S I S V L V I G L I I Y P R S E L N I * K

      1770
RhPAAS  ....|....|....|
AAAAAAAAAAAAAAAA
K K K K

```

Allèle a1 de *R. wichuraiana*

Les séquences UTR sont de couleur bleu. Les codons start et stop sont surlignés en rose.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCGATCTGCTTTCTAGCCTTTATTGATCATCTGTTGTATCACCTAGCTGTGTTCAACTAATTCACCTCCAATCTAAATG
M

      90      100     110     120     130     140     150     160
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGTAGCTTCCCATTCACAGGGATCTACAAGAGATCGCCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCTCGAAGAGTTTCAG
G S F P F H R D L Q E I A S S Q L T K A L D L E E F R

      170     180     190     200     210     220     230     240
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTACTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCCAAGCCGAGTTG
K Q G H M V I N F I A D Y Y Q N I E K Y P V P S R V

      250     260     270     280     290     300     310     320
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACCAGGGTATTTGAAAAATGCCTACCAGTGTGAGCCCATATGACCCTGAACCCATCTCAACCATCCTTAGAGATGTT
E P G Y L K K C L P V S A P Y D P E P I S T I L R D V

      330     340     350     360     370     380     390     400
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAGGATCACATTGTTCTGCGCTAACACATTGGCAAAGTCCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTGC
Q D H I V P G L T H W Q S P N F F A Y F S S T A S T A

      410     420     430     440     450     460     470     480
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGATTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGGTTCAACTGGGTTTCATCACCAGGAGCAACCGAGC
G F L G E I L T T G F N V V G F N W V S S P A A T E

      490     500     510     520     530     540     550     560
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCGAAAACATAGTCATGGATTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTCCATTTCTCTGGCAATGGCGGCGGT
L E N I V M D W L G D M L Q L P K S F H F S G N G G G

      570     580     590     600     610     620     630     640
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTGCACAATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACTCCGAATTGGCAG
V L H G S T C E A I V C T M V A A R D Q M L L R I G R

      650     660     670     680     690     700     710     720
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAGAATTTGGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTCAGACCAAACATAGCACACTTCAAAGGCTACCCAAATTGTTGGAA
E N L G K L V V Y G S D Q T H S T L Q K A T Q I V G

```



```

      730      740      750      760      770      780      790      800
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAGACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGACA
    I N T E N F R A I K T T K S T G F A L S P E M L R L T

      810      820      830      840      850      860      870      880
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    ATAAGTTCCGACTTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCACAATGGGCACAACCGCCACCCTGCTATTGA
    I S S D L E K G L V P L F L C A T M G T T A T T A I D

      890      900      910      920      930      940      950      960
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TCCATTGGAGGCACCTATGTCTAGTAGCAAAAGAATACGGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGCTGGAAGTGCTT
    P L E A L C H V A K E Y G V W V H V D A A Y A G S A

      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCATTTGTCCAGAATTTCCGGCATTTCATTAACGGCGTAGAGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTCAACCCCATAGTGGTTA
    C I C P E F R H F I N G V E G A N S F S F N P H K W L

      1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTCCTGGAATGGATTGCTGTGCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTTGGCAAGTTCACGTGTCGACGAATCCGGAGTT
    F T G M D C C C L W V K N P S V L A S S L S T N P E F

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTTGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGAGGTTTCGCT
    L R N K A S D S K Q V V D Y K D W Q I A L S R R F R

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CATTGAAGCTGTGGCTTGTGCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAGAACTTTATTCGTATCCATGTCAAATGGCC
    S L K L W L V L R S Y G V A N L R N F I R I H V K M A

      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AAGACTTTTGAAGGGCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAGATTCTGGTGCCTAGAACTTCTCCTTGGTCTGCTTCA
    K T F E G L V R M D K R F E I L V P R N F S L V C F R

      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AATTTACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGATGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATTGCTGG
    I S P S A L I S S N E D D E I G M V N E V N C K L L

      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AGGCCATCAATGCATCAGGTAAAGCATACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTACGTGCTTCGTTGCGCGGTTGGT
    E A I N A S G K A Y M T H A V V G G L Y V L R C A V G

      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCAACTCTGACCGAGGAAAAGCACATAGTCGAGGCTTGAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGTA
    A T L T E E K H I V E A W N V V Q D H A Q A I L S T Y

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
a1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTGATAATAAGTAAACTACTTGTACTACGTACCATGGAAATAAAGAATATCTGTGTGTGGTAATAGTCGAAAATGCTTC
    * * * V K L L V L R T M E I K N I C V W * * S K M L

      1690
a1  ....|....|....|
    AATCTCTGTGCTGG
    Q S L C W

```

Allèle a2 de *R. wichuraiana*

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
a2  ATGGG
      M G

```

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TAGCTTCCCATTCACAGGGATCTACAAGAGATCGCCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCTCGAAGAGTTTCAGGA
      S F P F H R D L Q E I A S S Q L T K A L D L E E F R

      90     100     110     120     130     140     150     160
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTACTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCTAAGCCGAGTTGAA
      K Q G H M V I N F I A D Y Y Q N I E K Y P V L S R V E

      170     180     190     200     210     220     230     240
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CCAGGGTATTTGAAAAATGCCTACCAGTGTGAGCCCATATGACCCTGAACCCATCTCAACCATCCTTAGAGATGTTCA
      P G Y L K K C L P V S A P Y D P E P I S T I L R D V Q

      250     260     270     280     290     300     310     320
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GGATCACATTGTTCTCGGCCTAACACATTGGCAAAGTCCCAATTTCTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTGCTG
      D H I V P G L T H W Q S P N F F A Y F S S T A S T A

      330     340     350     360     370     380     390     400
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GATTTCTTGGTGAAATACTCACCCTGGATTAAATGTGGTGGGGTTCAACTGGGTTTCATCACCGGCAGCAACCGAGCTC
      G F L G E I L T T G F N V V G F N W V S S P A A T E L

      410     420     430     440     450     460     470     480
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GAAAACATAGTCATGGATTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTCTCTGGCAATGGCGGCGGTGT
      E N I V M D W L G D M L Q L P K S F H F S G N G G G V

      490     500     510     520     530     540     550     560
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTTGCTGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTGCACAAATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACGCCGAATTGGTAGAG
      L H G S T C E A I V C T M V A A R D Q M L R R I G R

      570     580     590     600     610     620     630     640
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AGAATTGGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTGAGACCAAAACATAGCACACTTCAAAGGCTACCCAAATTGTTGGAATC
      E N L G K L V V Y G S D Q T H S T L Q K A T Q I V G I

      650     660     670     680     690     700     710     720
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAGACTACAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGACAAT
      N T E N F R A I K T T K S T G F A L S P E M L R L T I

      730     740     750     760     770     780     790     800
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AAGTTCCGACTTGGA AAAAGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCACAATGGGCACAACCGCCACCCTGCTATTGATC
      S S D L E K G L V P L F L C A T M G T T A T T A I D

      810     820     830     840     850     860     870     880
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CATTGGAGGCACTATGTCATGTAGCAAAAGAATACGGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGCTGGAAGTGCCTGC
      P L E A L C H V A K E Y G V W V H V D A A Y A G S A C

      890     900     910     920     930     940     950     960
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    ATTTGTCCAGAAATTCGGCATTTCATTAACGCGTAGAGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTCAACCCCCATAAGTGGTTATT
      I C P E F R H F I N G V E G A N S F S F N P H K W L F

      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CACTGGAATGGATTGCTGTTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTAGCAAGTTCACTGTCGACGAATCCGGAGTTT
      T G M D C C C L W V K N P S V L A S S L S T N P E F

      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGGCA
      L R N K A S D S K Q V V D Y K D W Q I A L S R R F R A

      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTGAAGCTGTGGCTTGTGCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAGAAACTTTATTCTGATCCATGTCAAAATGGCCAA
      L K L W L V L R S Y G V A N L R N F I R I H V K M A K

```

```

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GACTTTTGAAGGGCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAGATTCTGGTGCCTAGAAACTTCTCCTTGGTCTGCTTTAGAA
      T F E G L V R M D K R F E I L V P R N F S L V C F R

      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTTCACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGATGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATTGCTGGAG
      I S P S A L I S S N E D D E I G M V N E V N C K L L E

      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCCATCAATGCATCAGGTAAAGCATACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTACGTGCTTCGTTGCGCGGTTGGTGC
      A I N A S G K A Y M T H A V V G G L Y V L R C A V G A

      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
a2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AACTCTGACTGAGGAAAAGCAGATAGTCGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGTAT
      T L T E E K H I V E A W N V V Q D H A Q A I L S T Y

      1530
a2  ....|....|
    GATAATAAGT
      * * *

```

Allèle a3 de *R. x hybrida* 'H190'

```

a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                                     ATG
                                     M

      10      20      30      40      50      60      70      80
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GGTAGCTTCCCATTCACAGGGATCTACAAGAGATCGCCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCTCGAAGAGTTTCAG
      G S F P F H R D L Q E I A S S Q L T K A L D L E E F R

      90      100      110      120      130      140      150      160
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTACTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCTAAGCCGAGTTG
      K Q G H M V I N F I A D Y Y Q N I E K Y P V L S R V

      170      180      190      200      210      220      230      240
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AACCTGGGTATTTGAAAAATGCCTACCAGTGTGAGCCCATATGACCCTGAACCCATCTCAACCATCCTTAGAGATGTT
      E P G Y L K K C L P V S A P Y D P E P I S T I L R D V

      250      260      270      280      290      300      310      320
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CAGAATCACATTGTTCTTGGCCTAACACATTGGCAAAGTCCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTGC
      Q N H I V P G L T H W Q S P N F F A Y F S S T A S T A

      330      340      350      360      370      380      390      400
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TGGATTTCTCGGTGAAATACTCACCAGTGGATTAAATGTGGTGGGATTCAACTGGGTTTCATCACCGGCAGCAACCGAGC
      G F L G E I L T T G F N V V G F N W V S S P A A T E

      410      420      430      440      450      460      470      480
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TCGAAAACATAGTCATGGATTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCAATGGCGGCGGT
      L E N I V M D W L G D M L Q L P K S F H F S G N G G G

      490      500      510      520      530      540      550      560
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GTTTTGCATGGAGTAACTTGTGAGGCCATTGTTGCACAATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACGCCGAATTGGTAG
      V L H G S T C E A I V C T M V A A R D Q M L R R I G S

      570      580      590      600      610      620      630      640
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CGAGAATTTGGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTTCAGATCAAAACATAGCACACTTCAAAAAGCTACCCAAATTGTTGGAA
      E N L G K L V V Y G S D Q T H S T L Q K A T Q I V G

```

```

      650      660      670      680      690      700      710      720
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAGACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTACTACCTGAGATGCTAAGATTGACA
    I N T E N F R A I K T T K S T G F A L L P E M L R L T

      730      740      750      760      770      780      790      800
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    ATAAGTTCCGACCTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCACAATGGGCACAACCGCCACCCTGCTATTGA
    I S S D L E K G L V P L F L C A T M G T T A T T A I D

      810      820      830      840      850      860      870      880
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TCCATTGGAGGCACCTATGTCATGTAGCAAAAGAATACAGCGTGTGGGTTCAATGTGGATGCTGCATATGCTGGAAGTGCTT
    P L E A L C H V A K E Y S V W V H V D A A Y A G S A

      890      900      910      920      930      940      950      960
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCATTTGTCCAGAATTTCCGGCATTTCATTAACGGCGTAGAGGGCGCAAATCTTTTAGTTTCAACCCCATAGTGGTTA
    C I C P E F R H F I N G V E G A N S F S F N P H K W L

      970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTCACTGGAATGGATTGCTGTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTGGCAAGTTCACGTGTCGACGAATCCGGAGTT
    F T G M D C C C L W V K N P S V L A S S L S T N P E F

      1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTTGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGG
    L R N K A S D S K Q V V D Y K D W Q I A L S R R F R

      1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CATTGAAGCTGTGGCTTGTGATAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAGAACTTTATTTCGTATCCATGTCAAATGGCC
    A L K L W L V I R S Y G V A N L R N F I R I H V K M A

      1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AAGACTTTTGAAGGGCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAGATTCTGGTTCCTAGAACTTCTCCTTGGTCTGCTTTAG
    K T F E G L V R M D K R F E I L V P R N F S L V C F R

      1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350     1360
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AATTCACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGATGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATTGCTGG
    I S P S A L I S S N E D D E I G M V N E V N C K L L

      1370     1380     1390     1400     1410     1420     1430     1440
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AGGCCATCAATGCATCAGGTAAAGCATACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTACGTGCTTCGTTGCGCGGTTGG
    E A I N A S G K A Y M T H A V V G G L Y V L R C A V G

      1450     1460     1470     1480     1490     1500     1510     1520
a3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TGCAACTCTGACTGAGGAAAAGCACATAGTCGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGTA
    A T L T E E K H I V E A W N V V Q D H A Q A I L S T Y

      1530
a2  ....|....|
    TTGATAATAA
    * * *

```

Allèle b1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTCCGGGCCATCAAGACTACAAAGTCAACTGAATTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGACAATAAGTTCAGACCT
    F R A I K T T K S T E F A L S P E M L R L T I S S D L

      90      100     110     120     130     140     150     160
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AGAAGAAGGGCTAGTGCCACTCTTTGTATGTGCCACAATAGGCACAACCTGCAACCACTGCTATTGATCCATTGGAGGCAC
    E E G L V P L F V C A T I G T T A T T A I D P L E A

```

```

      170      180      190      200      210      220      230      240
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TATGTCATGTAGCAAAAGAATACGGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGGTGCATATGCTGGAAGTGCATGCATTTGTCCAGAG
L C H V A K E Y G V W V H V D G A Y A G S A C I C P E

      250      260      270      280      290      300      310      320
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTCGACATTTTCATCGATGGCGTAGAGGGCGCAAACCTCTTTTAGTTTTAACCCCATAAATGGTTATTCACTGGAATGGA
F R H F I D G V E G A N S F S F N P H K W L F T G M D

      330      340      350      360      370      380      390      400
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTGCTGCTGCCTTTGGGTTAAGAATCCGAGTGCATTGGTACTTTCATTGTCAACGAATCCAGAGTTTTTGAGGAACACAG
C C C L W V K N P S A L V L S L S T N P E F L R N T

      410      420      430      440      450      460      470      480
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCAGTAACTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGACTGGCAAATAGTACTGAGCCGGAGGTTCCGAGCATTGAGGCTATGG
A S N S K Q V V D Y K D W Q I V L S R R F R A L R L W

      490      500      510      520      530      540      550      560
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CTTGTTCTAAGAAGCTACGGCGTGGCTAACCTTAGAACTTTATTTCGTTGCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGG
L V L R S Y G V A N L R N F I R C H V K M A K T F E G

      570      580      590      600      610      620      630      640
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAGATTGTGGTGCCTAGAGACTTCTCATTGGTCTGCTTTAGAATTTCACCATCGG
L V R M D K R F E I V V P R D F S L V C F R I S P S

      650      660      670      680      690      700      710      720
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATTGATCAGTAGGGATGAGGATGGTGAGATCGGTATGATAAACGAGGTCAACTGCAAGCTGCTAGATGCCATCAACGCA
A L I S R D E D G E I G M I N E V N C K L L D A I N A

      730      740      750      760      770      780      790      800
b1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCAGGTAAAGCATACATGACCCATGCTGTGGTTGGAGGTATCTTCTGCTGCGGTGCGCCATTGGTGCTACTCTGACAGA
S G K A Y M T H A V V G G I F L L R C A I G A T L T E

      810      820
b1  ....|....|....|....|....|....
AGAAAAGCACATAGTCGAGGCTTGAAT
E K H I V E A W N

```

Allèle b2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTCCGGGCCATCAAGACTACAAAGTCAACTGAATTTGCACATACACCTGAGATGCTAAGATTGACAATAAGTTCAGACCT
F R A I K T T K S T E F A L S P E M L R L T I S S D L

      90      100      110      120      130      140      150      160
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAAGAAGGGCTAGTGCCACTCTTTGTATGTGCCACAATAGGCACAACCTGCAACCACTGCTATTGATCCATTGGAGGCAC
E E G L V P L F V C A T I G T T A T T A I D P L E A

      170      180      190      200      210      220      230      240
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TATGTCATGTAGCAAAAGAATACGGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGGTGCATATGCTGGAAGTGCATGCATTTGTCCAGAG
L C H V A K E Y G V W V H V D G A Y A G S A C I C P E

      250      260      270      280      290      300      310      320
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTCGACATTTTCATCGATGGCGTAGAGGGCGCAAACCTCTTTTAGTTTTAACCCCATAAATGGTTATTCACTGGAATGGA
F R H F I D G V E G A N S F S F N P H K W L F T G M D

      330      340      350      360      370      380      390      400
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTGCTGCTGCCTTTGGGTTAAGAATCCGAGTGCATTGGTACTTTCATTGTCAACGAATCCAGAGTTTTTGAGGAACACAG
C C C L W V K N P S A L V L S L S T N P E F L R N T

```

```

      410      420      430      440      450      460      470      480
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CCAGTGACTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGACTGGCAAATAGCACTGAGCCGGAGGTTCCGAGCATTGAGGCTATGG
    A S D S K Q V V D Y K D W Q I A L S R R F R A L R L W

      490      500      510      520      530      540      550      560
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CTTGTTCTAAGAAGCTACGGCGTGGCTAACCTTAGAACTTTATTTCGTTGCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGG
    L V L R S Y G V A N L R N F I R C H V K M A K T F E G

      570      580      590      600      610      620      630      640
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAGATTGTGGTGCCTAGAGACTTCTCATTGGTCTGCTTTAGAATTTACCATCGG
    L V R M D K R F E I V V P R D F S L V C F R I S P S

      650      660      670      680      690      700      710      720
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CATTGATCAGTAGGGATGAGGATGGTGAGATCGGTATGATAAACGAGGTCAACTGCAAGCTGCTAGATGCCATCAACGCA
    A L I S R D E D G E I G M I N E V N C K L L D A I N A

      730      740      750      760      770      780      790      800
b2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TCAGGTAAAGCATACATGACCATGCTGTGGTTGGAGGTATCTTCTGCTGCGGTGCGCCATTGGTGCTACTCTGACAGA
    S G K A Y M T H A V V G G I F L L R C A I G A T L T E

      810      820
b2  ....|....|....|....|....|....|....|
    AGAAAAGCACATAGTCGAGGCTTGAAT
    E K H I V E A W N

```

Allèle b3

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTCCGGGCCATCAAGACTACAAAGTCAACTGAATTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGACAATAAGTTCAGACCT
    F R A I K T T K S T E F A L S P E M L R L T I S S D L

      90      100      110      120      130      140      150      160
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AGAAGAAGGGCTAGTGCCACTCTTTGTATGTGCCACAATAGGCACAACCTGCAACCACTGCTATTGATCCATTGGAGGCAC
    E E G L V P L F V C A T I G T T A T T A I D P L E A

      170      180      190      200      210      220      230      240
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TATGTCATGTAGCAAAAGAATACGGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGGTGCATATGCTGGAAGTGCATGCATTTGTCCAGAG
    L C H V A K E Y G V W V H V D G A Y A G S A C I C P E

      250      260      270      280      290      300      310      320
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTTGACATTTTCATCGATGGCGTAGAGGGCGCAAACCTCTTTTACTTTTAACCCCATAAATGGTTATTCAGTGAATGGA
    F R H F I D G V E G A N S F T F N P H K W L F T G M D

      330      340      350      360      370      380      390      400
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    TTGCTGCTGCCTTTGGGTTAAGAATCCGAGTGCATTGGTACTTTTCATTGTCAACGAATCCAGAGTTTTTGAGGAACACAG
    C C C L W V K N P S A L V L S L S T N P E F L R N T

      410      420      430      440      450      460      470      480
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CCAGTAACTCAAAGCAAGTTGTGGACTACAAAGACTGGCAAATAGCACTGAGCCGGAGGTTCCGAGCATTGAGGGTATGG
    A S N S K Q V V D Y K D W Q I A L S R R F R A L R V W

      490      500      510      520      530      540      550      560
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CTTGTTCTAAGAAGCTACGGCGTGGCTAACCTTAGAACTTTATTTCGTAGCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGG
    L V L R S Y G V A N L R N F I R S H V K M A K T F E G

      570      580      590      600      610      620      630      640
b3  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GCTTGTGAGAATGGACAAGAGGTTTGAGATTGTGGTGCCTAGAGACTTCTCATTGGTCTGCTTTAGAATTTACCATCGG
    L V R M D K R F E I V V P R D F S L V C F R I S P S

```

```

        650      660      670      680      690      700      710      720
b3  CATTGATCAGTAGGGATGAGGATGGTGAGATCGGTATGATAAACGAGGTCAACTGCAAGCTGCTAAATGCCATCAACGCA
    A L I S R D E D G E I G M I N E V N C K L L N A I N A

        730      740      750      760      770      780      790      800
b3  TCAGGTAAAGCATACATGACCCATGCTGTGGTTGGAGGTATCTTTCTGCTGCGGTGCGCCATTGGTGCTACTCTGACAGA
    S G K A Y M T H A V V G G I F L L R C A I G A T L T E

        810      820
b3  AGAAAAGCACATAGTCGAGGCTTGAAT
    E K H I V E A W N

```

Alignement des séquences RhPAAS

<i>Rosa wichuraiana</i> a1	MGSFPPHRLDQEIASSQLTKALDLEEFRKQGHMVINFIADYYQNIIEKYPV	50
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	MGSFPPHRLDQEIASSQLTKALDLEEFRKQGHMVINFIADYYQNIIEKYPV	18
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	MGSFPPHRLDQEIASSQLTKALDLEEFRKQGHMVINFIADYYQNIIEKYPV	18
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	MGSFPPHRLDQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVINFIADYYQNIIEKYPV	50
<i>Rosa x damascena</i> Miller	MGSFPPHQDLQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVIDFIADYYQNIIEKYPV	50
	*****;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	PSRVEPGYLKKCLPVSAPYDPEPISTILRDVQDHIVPGLTHWQSPNFFAY	100
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	LSRVEPGYLKKCLPVSAPYDPEPISTILRDVQDHIVPGLTHWQSPNFFAY	68
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	LSRVEPGYLKKCLPVSAPYDPEPISTILRDVQNHIVPGLTHWQSPNFFAY	68
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	LSRVEPGYLKKCLPVSAPYDPEPISTILRDVQNHIVPGLTHWQSPNFFAY	100
<i>Rosa x damascena</i> Miller	LSRVEPGYLKKCLPESAPYDPEPISTILKDVQDHIVPGLTHWQSPNFFAY	100
	*****;***;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWSSPAATELENIVMDWLGDMLQLP	150
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWSSPAATELENIVMDWLGDMLQLP	118
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWSSPAATELENIVMDWLGDMLQLP	118
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWSSPAATELENIVMDWLGDMLQLP	150
<i>Rosa x damascena</i> Miller	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWSSPAATELENIVMDWLGDMLQLP	150
	*****;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	KSFHFSGNGGGVLHGSTCEAIVCTMVAARDQMLLRIGRENGLKLVVYGS	200
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	KSFHFSGNGGGVLHGSTCEAIVCTMVAARDQMLLRIGRENGLKLVVYGS	168
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	KSFHFSGNGGGVLHGSTCEAIVCTMVAARDQMLRRIGSENGLKLVVYGS	168
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	KSFHFSGNGGGVLHGSTCEAIVCTMVAARDQMLRRIGSENGLKLVVYGS	200
<i>Rosa x damascena</i> Miller	KSFHFSGNGGGVLHGSTCEAIVCTMVAARDQMLRRIGSENGLKLVVYGS	200
	*****;***;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	QTHSTLQKATQIVGINTENFRAIKTTKSTGFALSPPEMLRLTISSDLEKGL	250
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	QTHSTLQKATQIVGINTENFRAIKTTKSTGFALSPPEMLRLTISSDLEKGL	218
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	QTHSTLQKATQIVGINTENFRAIKTTKSTGFALLPEMLRLTISSDLEKGL	218
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	QTHSTLQKATQIVGINTENFRAIKTTKSTGFALSPPEMLRLTISSDLEKGL	250
<i>Rosa x damascena</i> Miller	QTHSTLQKATQIVGINTENFRAIKTTKSTGFALSPPEMLRLTISSDLEKGL	250
	*****;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	VPLFLCATMGTTATTATDPLEALCHVAKEYGVVHVDAAYAGSACICPEF	300
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	VPLFLCATMGTTATTATDPLEALCHVAKEYGVVHVDAAYAGSACICPEF	268
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	VPLFLCATMGTTATTATDPLEALCHVAKEYSVVHVDAAYAGSACICPEF	268
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	VPLFLCATIGTTATTATDPLEALCHVAKEYGVVHVDAAYAGSACICPEF	300
<i>Rosa x damascena</i> Miller	VPLFLCATIGTTATTATDPLEALCHVAKEYGVVHVDAAYAGSACICPEF	300
	*****;*****;*****;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	RHFINGVEGANSFSFNPHKWLFTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	350
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	RHFINGVEGANSFSFNPHKWLFTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	318
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	RHFINGVEGANSFSFNPHKWLFTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	318
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	RHFINGVEGANSFSFNPHKWLFTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	350
<i>Rosa x damascena</i> Miller	RHFINGVEGANSFSFNPHKWLFTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	350
	*****;*****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	NKASDSKQVVDYKDWQIALSRRFRSLKLWLVLRSYGVANLRNFIRIHVKM	400
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	NKASDSKQVVDYKDWQIALSRRFRALKLWLVLRSYGVANLRNFIRIHVKM	368
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	NKASDSKQVVDYKDWQIALSRRFRALKLWLVLRSYGVANLRNFIRIHVKM	368
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	NKASDSKQVVDYKDWQIALSRRFRALKLWLVLRSYGVANLRNFIRIHVKM	400
<i>Rosa x damascena</i> Miller	NKASDSKQVVDYKDWQIALSRRFRALKLWLVLRSYGVANLRNFIRIHVM	400
	*****;*****;*****;*****	

<i>Rosa wichuraiana</i> a1	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRNFSLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	450
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRNFSLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	418
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRNFSLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	418
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRNFSLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	450
<i>Rosa x damascena</i> Miller	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRNFSLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	450

<i>Rosa wichuraiana</i> a1	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGGLYVLRCAVGATLTTEEKHIVEAWN	500
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGGLYVLRCAVGATLTTEEKHIVEAWN	500
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGGLYVLRCAVGATLTTEEKHIVEAWN	500
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGGLYVLRCAVGATLTTEEKHIVEAWN	500
<i>Rosa x damascena</i> Miller	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGGLYVLRCAVGATLTSEEKHIVEAWK	500
	** : ***** : ***** : *****	
<i>Rosa wichuraiana</i> a1	AQAILSTYVKLLVLRTEIKNICVWSKMLQSLCW	534
<i>Rosa wichuraiana</i> a2	AQAILSTYVKLLVLRTEIKNICVWSKMLQSLCW	534
<i>Rosa wichuraiana</i> a3	AQAILSTYVKLLVLRTEIKNICVWSKMLQSLCW	534
<i>Rosa x hybrida</i> 'Fragrand Cloud'	AQAILSTY-----	508
<i>Rosa x damascena</i> Miller	AKAILSTYW-----	509
	* : *****	